

**LAPORAN PENELITIAN KOMPETITIF INDIVIDUAL  
TAHUN ANGGARAN 2016**

**POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT  
STEROID MIKROALGA *Chlorella sp.***

Nomor SP DIPA	:	DIPA BLU: DIPA-025.04.2.423812/2016
Tanggal	:	7 Desember 2015
Satker	:	(423812) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
KodeKegiatan	:	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Kesejahteraan, dan Subsidi Pendidikan Tinggi Islam
Kode Sub Kegiatan	:	(008) Penelitian Bermutu
Kegiatan	:	(004) Dukungan Operasional Pendidikan

Oleh:

**A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP. 19820616 200604 1 002**



**KEMENTERIAN AGAMA  
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

## **HALAMAN PENGESAHAN**

Laporan Penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 9 September 2016

Mengetahui,

Ketua LP2M  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Peneliti,

Dr. Hj. Mufidah Ch., M.Ag.  
NIP. 19600910 198903 2 001

A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP. 19820616 200604 1 002

## **PERNYATAAN KESANGGUPAN MENYELESAIKAN PENELITIAN**

Kami bertanda tangan di bawah ini, :

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.

NIP : 19820616 200604 1 002

Pangkat/ Golongan : Lektor/ III-c

Fakultas/ Jurusan : SAINTEK/ Kimia

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Saya sanggup menyelesaikan penelitian dan menyerahkan laporan hasil penelitian beserta kelengkapannya dengan batas waktu yang telah ditetapkan.
2. Apabila sampai batas waktu yang ditentukan kami belum menyerahkan laporan hasil, maka kami sanggup mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima.

Malang, 26 Februari 2016

Peneliti,

A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP. 19820616 200604 1 002

## **PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN**

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP : 19820616 200604 1 002  
Pangkat/Golongan : IIIc/ Lektor  
Fakultas/ Jurusan : Saintek/ Kimia

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila di kemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah saya terima dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 9 September 2016  
Peneliti,

A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP. 19820616 200604 1 002

## **PERNYATAAN TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR**

Kami yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP : 19820616 200604 1 002  
Pangkat/ Gol.Ruang : Penata/ III-c  
Tempat, Tgl. Lahir : Nganjuk, 16 Juni 1982  
Judul Penelitian : Ketua Peneliti

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Saya TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR;
2. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa kami sedang tugas belajar, maka secara langsung kami menyatakan mengundurkan diri dan mengembalikan dana yang telah kami terima dari Program Penelitian Kompetitif 2016.

Demikian Surat Pernyataan ini kami buat sebagaimana mestinya.

Malang, 9 September 2016  
Peneliti,

A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP. 198206162006041002

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala kemudahan yang diberikan-Nya dalam pelaksanaan dan penulisan laporan penelitian yang berjudul ” **POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp.***” ini, sehingga dapat terlaksana dengan baik dan selesai pada waktunya. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kami Nabi Agung Muhammad SAW yang telah membimbing umatnya ke jalan yang benar.

Selesainya penulisan laporan ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, teriring rangkaian ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memotivasi segenap civitas kampus utamanya dosen untuk melakukan pengembangan keilmuan salah satunya melalui kegiatan penelitian
2. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LP2M) Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Rekan-rekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya Jurusan Kimia, yang telah membantu dengan sepenuh hati dengan saran dan kritik yang membangun, sehingga laporan ini dapat terselesaikan.
5. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu serta keluarga di rumah atas dukungan moril dan materiil sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Kami menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, masukan dan saran yang membangun dari berbagai pihak sangat kami hargai demi kesempurnaan laporan ini.

Malang, 9 September 2016  
Peneliti,

A.GhanaimFasya, M.Si.

## POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp.*

### ABSTRAK

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu ciptaan Allah SWT. yang bermanfaat. *Chlorella sp.* mengandung steroid yang berpotensi digunakan sebagai antikanker dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas, mengetahui aktivitas antioksidan serta mengetahui jenis senyawa steroid yang terdapat pada isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.*.

*Chlorella sp.* dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dan pemanenan dilakukan pada fase stasioner (hari ke-10). Mikroalga *Chlorella sp.* diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan larutan HCl 2 N, kemudian diekstrak dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Fraksi etil asetat dan petroleum eter diuji fitokimia untuk memastikan kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya. Senyawa steroid dalam fraksi etil asetat dan petroleum eter dipisahkan dengan KLTP. Isolat steroid hasil KLTP diuji toksisitas dengan metode BSLT dan diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer FTIR UV-Vis dan LC-MS.

Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L. dengan nilai  $LC_{50}$  14,9625 dan 19,6889 ppm. Isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai antikanker atau antitumor karena memiliki nilai  $LC_{50}$  di bawah 30 ppm. Isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dengan nilai  $EC_{50}$  77,78 dan 73,82 ppm. Aktivitas antioksidan isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* tergolong kuat karena memiliki nilai  $EC_{50}$  di bawah 100 ppm. Hasil identifikasi dengan uji fitokimia, spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS menunjukkan bahwa isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* positif mengandung senyawa steroid.

**Kata kunci :** *Chlorella sp.*, steroid, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), toksisitas dan antioksidan.

## ANTICANCER, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND IDENTIFICATION OF TLC ISOLATES OF STEROID COMPOUND FROM *Chlorella sp.* MICROALGAE

### ABSTRACT

*Chlorella sp.* is one of Allah creation that very usefull. *Chlorella sp.* contain steroid compound that can be used as anticancer and antioxidant. The objectives of this research is to know the toxicity level, antioxidant activity and to know the kind of the steroid compounds separation on ethyl acetate and petroleum eter fraction from *Chlorella sp.* microalgae isolated with Thin Layer Chromatography (TLC).

*Chlorella sp.* was cultivated in Tauge Extract Medium (TEM) 4 % and harvesting of at stationary phase (10<sup>th</sup> day). Microalgae *Chlorella sp.* was extracted by maceration method using methanol solvent. The methanol extract was hydrolyzed with HCl 2 N and then partitioned with ethyl acetate and petroleum ether sovents. Ethyl acetate and petroleum ether fraction was tested by phytochemicals test to fine out the content of its activecompounds. The steroid compound fromethyl acetate and petroleum ether fraction was separated with preparative TLC. The toxicity level of TLC isolates was determaind by BSLT methods and antioxidant activity was determaind by DPPH methods. The isolates was identified by FTIR spectrophotometer, UV-Vis spectrophotometer and LC-MS.

The result showed that TLC isolates of *Chlorella sp.* microalgae ethyl acetate and petroleum ether fraction was toxic against *Arthemiasalina* L. Brine shrimp larvae with LC<sub>50</sub> value 14,9625 and 19,6889 ppm. Isolates of *Chlorella sp.* microalgae ethyl acetate and petroleum ether fraction has potential as anticancer or antitumor because its LC<sub>50</sub> value under 30 pp. Isolates of *Chlorella sp.* microalgae ethyl acetate and petroleum ether fraction has antioxidant activity to DPPH wth EC<sub>50</sub> value 77,78 and 73,82 ppm. Antioxidant activity of *Chlorella sp.* microalgae ethyl acetate and petroleum ether fraction was strong because its EC<sub>50</sub> value under 100 ppm. Identified by FTIR spectrophotometer, UV-Vis spectrophotometer and LC-MS showed that of *Chlorella sp.* microalgae ethyl acetate and petroleum ether fraction was positive contain steroid compound.

**Key word:** *Chlorella sp.*, steroid, Thin Layer Chromatography (TLC), toxicity and antioxidant.



## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	i
PERNYATAAN KESANGGUPAN MENYELESAIKAN PENELITIAN..	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN.....	iii
PERNYATAAN SEDANG TIDAK TUGAS BELAJAR .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
ABSTRAK .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii

### BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	2
1.3. Tujuan Penelitian .....	2
1.4. Batasan Masalah .....	2
1.5. Manfaat Penelitian .....	3
1.6. Urgensi Penelitian .....	3

### BAB II STUDI PUSTAKA

2.1. Kajian Riset Sebelumnya .....	5
2.2. Kajian Teoritis .....	8
2.2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	8
2.2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif <i>Chlorella sp.</i> .....	8
2.2.3 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif (Steroid) <i>Chlorella sp.</i> .....	9
2.2.4 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	9
2.2.5 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	10
2.2.6 Uji Antioksidan terhadap DPPH Uji Antioksidan terhadap DPPH .....	10
2.2.7 Identifikasi Steroid Dengan Spektrofotometer UV-Vis .....	10
2.2.8 Identifikasi Steroid Dengan Spektrofotometer FTIR .....	11
2.2.9 Identifikasi Steroid Dengan LC-MS .....	11
2.3. Road Map Penelitian .....	11

### BAB III METODOLOGI

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	13
3.2. Alat dan Bahan .....	13
3.2.1. Alat .....	13
3.2.2. Bahan .....	13
3.3. Tahapan Penelitian .....	14
3.4. Metode Penelitian .....	14
3.4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorellasp.</i> .....	14
3.4.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorellasp.</i> .....	15
3.4.3 Ekstraksi Komponen Aktif .....	15
1) Maserasi dengan Pelarut Metanol .....	15
2) Hidrolisis dilanjutkan partisi dengan etilasetat dan Petroleun eter ...	15
3.4.4 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Uji Reagen.....	16

3.4.5 Pemisahan Golongan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	16
3.4.6 Uji toksisitas dengan Menggunakan Larva Udang <i>Artemia salina</i> .....	16
3.4.7 Uji aktivitas Antioksidan terhadap DPPH .....	17
3.4.8 Identifikasi Isolat Hasil KLTP .....	18
3.4.8.1 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis .....	18
3.4.8.2 Identifikasi dengan Spektrofotometer FTIR .....	18
3.4.8.3 Identifikasi dengan LC-MS .....	18
3.4.9 ANALISIS DATA .....	19
 <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>20</b>
4.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge.....	21
4.2 Preparasi Sampel Biomassa <i>Chlorella sp.</i> .....	24
4.3 Isolasi Komponen Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	26
4.4 Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Uji Reagen .....	29
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	30
4.6 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> L. ....	35
4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH.....	41
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	45
4.9 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Spektrofotometer FTIR .....	47
4.10 Identifikasi dengan LC-MS .....	50
 <b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>51</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>60</b>

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Banyaknya masalah kesehatan yang terjadi menyebabkan kesadaran masyarakat akan kesehatan semakin meningkat. Masyarakat semakin gemar mengkonsumsi makanan atau suplemen yang mendukung kesehatan terutama yang berbahan alami. Eksplorasi bahan hayati terus dilakukan untuk menambah keanekaragaman senyawa obat yang telah ada atau mencari senyawa obat baru.

Surat Luqman ayat 10 dan surat asy Syu'ara ayat 7 menegaskan bahwa Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik dan bermanfaat bagi kemaslahatan manusia. Tumbuh-tumbuhan dapat dimanfaatkan oleh manusia untuk berbagai keperluan seperti sebagai bahan makanan, kosmetik, obat-obatan dan sebagainya. Salah satu tumbuhan tingkat rendah yang memiliki banyak manfaat adalah mikroalga *Chlorella sp.*

*Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai suplemen dan penghasil komponen bioaktif bahan farmasi dan kedokteran. *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan untuk mencegah penyakit kanker, menurunkan tekanan darah tinggi, kadar kolesterol darah dan sebagainya (Steenblock, 1996). Keunggulan mikroalga antara lain hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas, dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988). Selain itu, mikroalga dapat hidup dalam air tawar dan air laut, tidak berkompetisi dengan produksi bahan pangan (Supriadi, 2012).

Bioaktivitas sangat dipengaruhi oleh kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. Beberapa penelitian menunjukkan kandungan senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.*, namun masih belum diketahui jenisnya secara spesifik. Pentingnya mengetahui potensi antikanker dan antioksidan serta belum diketahuinya jenis senyawa pada mikroalga *Chlorella sp.* mendorong perlunya dilakukan uji toksisitas sebagai *screening* awal antikanker dan uji antioksidan serta identifikasi jenis senyawa steroid yang terkandung.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana toksisitas dari isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.*?,
2. Bagaimana aktivitas antioksidan dari isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.*?,
3. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.*?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui toksisitas dari isolat steroid hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLTP) mikroalga *Chlorella sp.*,
2. Mengetahui aktivitas antioksidan dari isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*,
3. Mengetahui jenis senyawa steroid yang terdapat pada isolat hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*.

## 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada medium ekstrak tauge (MET) kacang hijau. Kultivasi dikondisikan pada pH 7, suhu ruang (25-27 °C) dan intensitas cahaya 1000-4000 lux,
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, dilanjutkan hidrolisis asam dan ekstraksi dengan pelarut nonpolar dan semipolar yaitu petroleum eter dan etil asetat
3. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP),
4. Uji toksistas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethal Test (BSLT)* menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach,
5. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil),
6. Identifikasi jenis senyawa steroid dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometer FTIR dan LC-MS.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai potensi antikanker dan antioksidan seta jenis senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* sehingga dapat dimanfaatkan di bidang farmakologi.

### **1.6. Urgensi Penelitian**

Mendesaknya kebutuhan akan senyawa obat yang disebabkan meningkatnya masalah kesehatan, seperti banyaknya kasus kematian akibat penyakit tertentu, resistennya penyakit terhadap obat dan berbahaya efek samping obat tertentu, menjadi masalah serius yang mendorong inovasi baru untuk mencari bahan farmakologis. Konsep *Back to Nature* menyadarkan masyarakat akan pentingnya mengkonsumsi obat-obatan yang berasal dari alam.

Akhir-akhir ini berbagai penelitian mulai mengarah pada potensi mikroalga. Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi, antara lain hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas, dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988). Keunggulan lain dari mikroalga adalah potensinya sebagai sumber pangan yang mengandung protein, lipid, serta sebagai bahan dasar obat-obatan atau farmasi. Selain itu, mikroalga dapat hidup dalam air tawar dan air laut, tidak berkompetisi dengan produksi bahan pangan, konsumsi air rendah dan biaya produksi tidak terlalu tinggi (Supriadi, 2012).

Masa panen mikroalga lebih cepat dibandingkan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi. Meyer dan Ausubel (1999) menyebutkan dalam Rakhmawati dan Sutimin (2006) bahwa pemanenan makroalga yang paling tepat adalah pada saat 60 hari (2 bulan) setelah tanam, sedangkan kultivasi mikroalga dapat dilakukan dengan cepat dan singkat yaitu dengan waktu panen 7- 10 hari (de Godos, *et al.*, 2010). Panen mikroalga, minimal 30 kali lebih banyak dibandingkan tumbuhan darat. Selain itu, Kondisi iklim tropis Indonesia dengan cahaya matahari sepanjang tahun, sangat sesuai untuk kehidupan mikroalga sehingga mikroalga sangat prospektif apabila dikembangkan di Indonesia.

Berbagai penelitian mengenai manfaat dari mikroalga *Chlorella sp.* telah dilaporkan oleh para peneliti. *Chlorella sp.* memiliki bioaktivitas sebagai antikanker (Diastuti dan Warsinah, 2010), antibakteri (Khamidah, dkk., 2013), toksisitas (Amaliyah, dkk., 2013) dan antioksidan (Anggraeni, dkk., 2014). Uji toksisitas yang dilakukan oleh Desianti, dkk., (2014) menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* memiliki efek toksisitas terhadap larva udang *Artemia selina* Leach dengan nilai  $LC_{50}$  yaitu 32,6710 ppm, sedangkan fraksi etil asetat memiliki nilai  $LC_{50}$  43,3044 ppm. Nilai  $LC_{50}$  30 – 1000 ppm memiliki kategori bahan yang toksik. Senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* juga dapat digunakan sebagai antioksidan. Anggraeni, dkk., (2014) menyebutkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum eter dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  berturut-turut yaitu 27,26 ppm dan 332,7 ppm.

Desianti, dkk. (2014) menggunakan metode hidrolisis dengan HCl 2N dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* Hasil identifikasi senyawa aktif menunjukkan adanya senyawa steroid. Kandungan senyawa steroid pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* juga diperkuat oleh penelitian Khamidah, dkk. (2013), Amaliyah, dkk. (2013), serta Bariyyah, dkk. (2013) yang menyatakan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif steroid. Senyawa steroid yang teridentifikasi masih belum murni (berupa campuran), sehingga perlu dilakukan pemisahan menjadi senyawa-senyawa tunggal untuk selanjutnya diidentifikasi.

Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan mikroalga khususnya *Chlorella sp.* maka sangat perlu dilakukan ekstraksi komponen aktif *Chlorella sp.* dilanjutkan dengan proses hidrolisis dan partisi dengan beberapa pelarut guna mengekstrak aglikon yang terpisah dari glikonnya. Ekstraksi dilanjutkan dengan identifikasi adanya senyawa steroid dengan uji reagen dan dilakukan pemisahan senyawa-senyawa tersebut dengan KLT sehingga diperoleh senyawa tunggal. Isolat hasil KLT diuji toksisitas dan antioksidannya serta diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS.

## BAB II

### STUDI PUSTAKA

#### 2.1 KAJIAN RISET SEBELUMNYA

Beberapa penelitian melaporkan bahwa *Chlorella sp.* merupakan salah satu mikroalga yang mempunyai berbagai aktivitas biologi (bioaktivitas). Penelitian dari Konishi, *et al.* (1985) dan Noda, *et al.* (1996) dalam Wahyuni (2006) melaporkan aktivitas antitumor dari *Chlorella vulgaris*. *Chlorella* membantu melindungi tubuh dalam memerangi virus dan kanker. Serangkaian studi selama tahun 1980 menunjukkan bahwa pertumbuhan tumor pada tikus dapat dikurangi atau dihentikan dengan menyuntikkan larutan *Chlorella* di sekitar pertumbuhan neoplastik. Dalam studi lain oleh peneliti yang sama, sel tumor dapat mati seluruhnya dengan menginjeksikan *Chlorella* (Adams, 2009). Amaliah, dkk. (2013) menyebutkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* berpotensi sebagai antikanker ditunjukkan dengan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach sebesar LC<sub>50</sub> 20,516 ppm (ekstrak metanol) dan 167,417 ppm (ekstrak etil asetat). Sedangkan penelitian Desianti, dkk. (2014) menunjukkan bahwa keempat fraksi *Chlorella sp.* bersifat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC<sub>50</sub> 43,3044 ppm (fraksi etil asetat); 32,9023 ppm (fraksi kloroform); 32,6710 ppm (fraksi petroleum eter) dan 34,2133 ppm (fraksi n-heksana).

Miranda, *et al.* (1998) melakukan penelitian pada *Spirulina maxima* yang memiliki kandungan senyawa fenolik,  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -tokoferol, yang memberikan perlindungan antioksidan dalam sistem *in vivo* maupun *in vitro*. Benedetti, *et al.* (2004) meneliti sifat antioksidan *phycocyanin* dari *Aphanizomenon flos-aquae* salah satu spesies alga uniseluler dari alga hijau biru yang hidup di air tawar dimana *phycocyanin* diketahui mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, sebagai penanda *fluorescent* dalam tes medis dan sebagai antioksidan, *anti-inflammatory* dan *neuroprotective*. Kusmiati (2010) melakukan ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink yang merupakan karotenoid alami yang berfungsi sebagai antioksidan. Bariyyah, dkk. (2013) menyatakan ekstrak metanol dan ekstrak etil

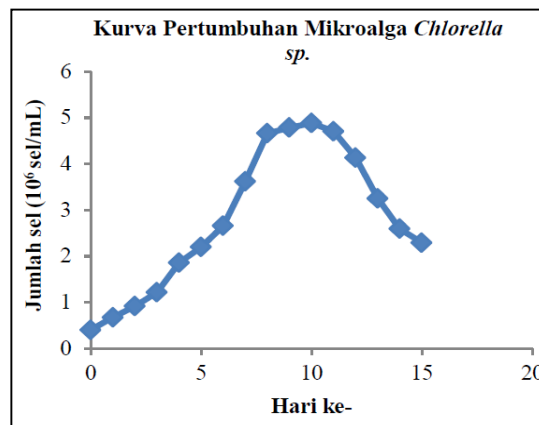
asetat *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi, yaitu dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 18,61 ppm dan 27,32 ppm. Anggraeni, dkk., (2014) menyebutkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum eter dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  berturut-turut yaitu 27,26 ppm dan 332,7 ppm. Senyawa yang diduga memiliki aktivitas tersebut adalah senyawa steroid.

Komponen bioaktif dari mikrolaga *Chlorella sp.* yang bisa menghasilkan efek farmakologis didapatkan dari biomassa *Chlorella sp.* Biomassa *Chlorella sp.* merupakan akumulasi dari sel *Chlorella sp.* hasil kultivasi dalam medium kultur. Untuk menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang baik tentu diperlukan kondisi lingkungan dengan nutrisi yang sesuai. Lewaru (2007) menyatakan bahwa beberapa faktor lingkungan kultur yang mempengaruhi kultur *Chlorella sp.* antara lain unsur hara serta kualitas air seperti pH, suhu, dan intensitas cahaya yang optimum. Salah satu media alami yang dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Menurut Wulandari, *et al.* (2010) tauge kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Penggunaan medium ekstrak tauge menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG). Hasil penelitian Prihantini, *et al.* (2005) menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan konsentrasi 4 % pada pH 7 dapat menghasilkan kerapatan sel yang cukup tinggi yaitu sebesar 5.677.625 sel/mL pada hari ke-10.

Proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* melalui empat fase pertumbuhan yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian. Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* selama 15 hari dalam MET 4 % tersaji pada Gambar 2.1. Berdasarkan Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8 yang ditandai dengan jumlah sel *Chlorella sp.* yang terus meningkat. Fase  $\frac{1}{2}$  eksponensial terjadi pada hari ke-4 dengan kelimpahan sel 1.856.000 sel/mL dan  $\frac{3}{4}$  eksponensial terjadi pada hari ke-6 dengan kelimpahan sel 2.656.000 sel/mL.



Fase awal stasioner terjadi pada hari ke-8 dengan kelimpahan sel 4.656.000 sel/mL. kelimpahan sel pada hari ke-10 adalah 4.880.000 sel/mL. Kemudian pada hari ke-11 kelimpahan sel cenderung berkurang yang disebabkan kurangnya ketersediaan nutrisi yaitu sebesar 4.704.000 sel/mL sehingga pada hari ke-11 sudah memasuki fase akhir stasioner atau fase awal kematian.



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Fasya, dkk., 2013)

Marliana (2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa Identifikasi tepenoid/steroid memberikan hasil positif setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard yang ditandai dengan timbulnya noda berwarna ungu hitam ( $R_f = 0,06$ ), ungu merah ( $R_f = 0,16$ ), ungu gelap ( $R_f = 0,24$ ), ungu ( $R_f = 0,37$ ;  $0,74$ ) dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4:1). Hidayah, dkk. (2015) melakukan pemisahan senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan KLTA dengan eluen n-heksana : etil asetat dengan variasi perbandingan konsentrasi yaitu 7:3, 7.5:2.5, 8:2, 8.5:1.5, dan 9:1. Hasil penelitian menunjukkan jumlah spot yang diperoleh berturut-turut adalah 10 spot, 11 spot, 13 spot, 8 spot, dan 8 spot. Sehingga dari penelitian ini diketahui eluen terbaik adalah eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8:2. Dari ke-13 spot tersebut diperoleh 8 spot yang tergolong senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard yaitu diantaranya berwarna pink ( $R_f 0,06$ ), hijau kecoklatan ( $R_f 0,11$ ), ungu (0,14), pink (0,16), pink (0,25), ungu (0,74), ungu kebiruan (0,80) dan hijau terang (0,91).

## **2.2 KAJIAN TEORITIS**

### **2.2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.**

Istilah *Chlorella* berasal dari bahasa latin yang terdiri dari kata “chloros” yang berarti hijau dan “ella” yang berarti kecil. Sel *Chlorella* berukuran kecil yaitu antara 2 sampai 12  $\mu\text{m}$ , yang berbentuk bulat dan elips. *Chlorella* mempunyai kloroplas dan dinding sel yang tipis (Bold dan Wynne, 1985). *Chlorella* sp. merupakan salah satu jenis fitoplankton dengan sistematika sebagai berikut (Wibowo dan Haryoto, 2004):

Filum	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Familia	: Chlorellaceae
Genus	: Chlorella
Spesies	: <i>Chlorella</i> sp.

### **2.2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif *Chlorella* sp.**

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa dapat sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987).

Adapun beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Karger, *et al.*, 1973).

### 2.2.3 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif (Steroid) *Chlorella sp.*

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

Kandungan senyawa steroid dan triterpenoid dapat diuji dengan metode Lieberman-Burchard yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan oleh steroid apabila dalam larutan terjadi perubahan warna hijau biru, sedangkan reaksi positif pada triterpenoid adalah terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut (Harbone, 1987). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995).

### 2.2.4 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil misalnya, menentukan jumlah komponen dalam campuran dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dikumpulkan dan digunakan untuk analisa berikutnya (Sastrohamidjojo, 2007).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga  $R_f$ . Harga  $R_f$  untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standart. Harga  $R_f$  didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2007):

$$\text{harga } R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

### 2.2.5 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah salah satu metode skrining untuk menentukan sifat toksik suatu senyawa atau ekstrak secara akut dengan menggunakan hewan coba *Artemia salina* L (Hendrawati, 2009).

Wawan (2003) dalam Halimah (2010) menyatakan bahwa pembagian nilai  $LC_{50}$  untuk ekstrak atau senyawa murni yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif adalah:

- a. Nilai  $LC_{50} < 30$  ppm memiliki potensi aktivitas sebagai anti tumor atau kanker.
- b. Nilai  $LC_{50}$  antara 30 - 200 ppm memiliki potensi sebagai anti mikroba.
- c. Nilai  $LC_{50} > 200$  kurang dari 1000 ppm bersifat pestisida.

### 2.2.6 Uji Antioksidan terhadap DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, 2003). Dalam metode DPPH terdapat parameter  $EC_{50}$  yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50 % yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil  $EC_{50}$  suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman dkk., 2005). Menurut Armala (2009) dalam Putra (2012), menyatakan tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji menggunakan metode DPPH dapat digolongkan menurut nilai  $IC_{50}/EC_{50}$ .

### 2.2.7 Identifikasi Steroid Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi golongan steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dari ekstrak *P. boergesenii* dan *S. stenophyllum* menunjukkan pita serapan UV-Vis yaitu  $\lambda_{max}$  290 – 310 nm. Jenis steroid yang teridentifikasi adalah fukosterol (Oliveira, *et al.* 2015),. Spektrum UV senyawa steroid penelitian Susilawati, dkk. (2015) dari hasil isolasi daun rimbang (Gambar 5) mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 197 nm, 271 nm dan 281 nm.

### 2.2.8 Identifikasi Steroid Dengan Spektrofotometer FTIR

Imamah, dkk., (2015) berhasil mengidentifikasi senyawa steroid dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang 3450,61  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), bilangan gelombang 2926,28  $\text{cm}^{-1}$  (C-H pada  $\text{CH}_3$ ), 2857,60  $\text{cm}^{-1}$  (C-H pada  $\text{CH}_2$ ), 1737,22  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1638,98  $\text{cm}^{-1}$  (C=C), 1465,93  $\text{cm}^{-1}$  dan 1387,09  $\text{cm}^{-1}$  (C-H tekuk), 1254,92  $\text{cm}^{-1}$  (C-O), 1164,47  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH alkohol tersier), 1064,03  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH alkohol primer), 752,22  $\text{cm}^{-1}$  dan 670,59  $\text{cm}^{-1}$  (C-H pada gugus alkena).

### 2.2.9 Identifikasi Steroid Dengan LC-MS

Metode LC-MS digunakan untuk analisis senyawa yang sangat polar, tidak tahan panas dan memiliki berat molekul yang relatif besar (Yoon, dkk., 2003). Diaz, *et al.* (2007) melakukan pemisahan dan penentuan sterol dalam minyak zaitun menggunakan HPLC-MS dengan ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI) menghasilkan senyawa erythrodiol, uvaol, kolesterol, fukosterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, dan sitostanol. Pada penelitian ini, jenis senyawa steroid yang akan diteliti adalah golongan fukosterol yang mempunyai  $m/z$  395.30 dengan metode APCI.

## 2.3 ROAD MAP PENELITIAN

Penelitian mengenai mikroalga *Chlorella sp.* telah dimulai sejak tahun 2012, dimulai dari penentuan kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* yang dikultivasi pada medium ekstrak tauge (MET). Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* berguna dalam penentuan waktu yang tepat untuk pemanenan *Chlorella sp.* Dari data yang telah diperoleh, diketahui bahwa mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan aktivitas paling tinggi pada pemanenan selama fase stasioner (10 jam). Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada *Chlorella sp.* diproduksi pada fase stasioner.

Pada tahap selanjutnya (2013 dan 2014), penelitian difokuskan pada pengujian potensi dari metabolit yang dihasilkan oleh mikroalga *Chlorella sp.*. Tahun 2013, dilakukan uji biokativitas (toksisitas, antioksidan dan antibakteri) ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* pada pelarut metanol (polar) dan etil asetat (semipolar). Selanjutnya, pada tahun 2014 dilakukan hidrolisis ekstrak kasar

mikroalga *Chlorella sp.* untuk memisahkan metabolit sekunder yang diduga merupakan senyawa aktif dari *Chlorella sp.* Hidrolisis dilakukan untuk memecah ikatan glikosida antara gugus gula (glikon) dan metabolit sekunder (aglikon) yang nantinya diekstrak dengan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda, yaitu etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana. Fraksi yang diperoleh dipekatkan dan diuji bioaktivitasnya untuk mengetahui potensi antioksidan, antikanker dan antibakterinya.

Setelah diketahui potensi dari metabolit sekundernya, pada tahap selanjutnya (2015) dilakukan penelitian untuk memisahkan atau memurnikan metabolit sekunder mikroalga *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Lapis Tipis, yang diawali dengan KLT analitik untuk penentuan eluen terbaik dan dilanjutkan dengan KLT preparative untuk memisahkan masing-masing senyawa yang ada. Isolate hasil KLTP dicek kemurniannya dengan KLT 2 Dimensi. Hasil penelitian menunjukkan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa steroid pada fraksi etil asetat dan petroleum eter adalah campuran n-heksana: etil asetat 4:1.

Pada tahap sekarang (2016) isolate hasil pemisahan KLTP diuji toksisitas dan aktivitas antioksidannya untuk mengetahui potensinya sebagai senyawa antikanker baru. Untuk mengetahui jenis senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS.

Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>		
Tahap I (2012)	Penentuan Kurva Pertumbuhan	Fase-fase pertumbuhan
Tahap II (2013)	Uji bioaktivitas ekstrak kasar	Fase terbaik
Tahap III (2014)	Hidrolisis dan uji bioaktivitas fraksi hasil partisi	Fraksi terbaik
Tahap IV (2015)	Pemisahan dengan KLT	Senyawa tunggal
Tahap V (2016)	Uji toksisitas dan antioksidan serta identifikasi jenis steroid	Struktur senyawa
Senyawa Antikanker		

Gambar 2.2 Road map Penelitian

## **BAB III.**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret - Agustus 2016 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah labu kultur 1000 mL, Lampu TL 36 Watt, Timer, *hotplate*, pipet tetes, sentrifuse, neraca analitik, statif, corong pisah 250 mL, lemari asam, oven, penjepit kayu, bola hisap, *magnetic stirrer*, corong *buchner*, *rotary evaporator vacum*, desikator, pengaduk gelas, gelas arloji, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas whatman no. 42, *shaker incubator*, aluminium foil, autoklaf, pipet mikro, gunting, pipa kapiler, penggaris, botol vial, gelas, pinset, lampu UV dan seperangkat KLT, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pipet mikro, Spektrofotometer Uv-Vis, spektrofotometer FTIR dan instrumen LC-MS.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.* Bahan yang digunakan untuk kultivasi *Chlorella sp.* adalah tauge kacang hijau dan akuades. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah metanol p.a., dan dilanjutkan dengan hidrolisis asam dengan HCl 2 N dan partisi menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Bahan-bahan kimia lainnya adalah reagen Liebermann-Buchard, plat KLT GF<sub>254</sub>, n-heksana p.a, aseton p.a, etil asetat p.a, larva udang *Artemia salina* L., larutan DPPH 0,2 mM, vitamin C, BHT, aquades, metanol HCl 37 %, natrium bikarbonat, reagen *Lieberman-Burchard* (asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, etanol absolut), ragi roti dan gas N<sub>2</sub>.

### **3.3 Tahapan Penelitian**

1. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*;
2. Preparasi sampel (biomassa *Chlorella sp.*);
3. Isolasi komponen aktif;
  - a. Maserasi dengan pelarut metanol
  - b. Hidrolisis dilanjutkan partisi dengan etil asetat dan petroleum eter
4. Uji reagen untuk memastikan adanya golongan senyawa steroid;
5. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis;
6. Uji Toksisitas dengan metod BSLT
7. Uji aktivitas antioksidan dengan metod DPPH
8. Identifikasi dengan UV-Vis, FTIR dan LC-MS
9. Analisis data.

### **3.4 Metode Penelitian**

#### **3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.***

##### **1) Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)**

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET (b/v) yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades selama 1 jam. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam akuades dengan masing-masing konsentrasi 4 % (v/v) (Prihantini, dkk., 2005).

##### **2) Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge**

Sebanyak 10 mL kultur *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam 60 mL medium ekstrak tauge. Labu kultur diletakkan ke dalam rak kultur dengan pencahayaan 2 buah lampu TL 36 Watt (intensitas cahaya 1000 - 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap

##### **3) Pemanenan biomassa *Chlorella sp.***

Mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikultivasi dan mencapai fase akhir stasioner dipanen dengan cara disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga terpisah antara biomassa dengan filtrat. Bagian biomassa (intraseluler) *Chlorella sp.* diambil untuk selanjutnya dianalisis kadar air dan dimaserasi.



### 3.4.2 Preparasi Sampel (biomassa *Chlorella sp.*)

Sampel biomassa *Chlorella sp.* diambil seluruhnya kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang (25 – 27 °C). Selanjutnya biomassa kering yang diperoleh ditimbang dan diekstraksi.

### 3.4.3 Ekstraksi Komponen Aktif

#### 1) Maserasi dengan pelarut metanol

Biomassa *Chlorella sp.* kering yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) (50 gr:250 mL), dilakukan maserasi selama  $\pm 24$  jam dengan pengocokan menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm  $\pm 5$  jam pada suhu kamar. Setelah itu, disaring dengan menggunakan corong buchner sehingga terpisah antara residu dan filtrat. Bagian residu dimaserasi kembali hingga 3 kali proses ekstraksi. Kemudian filtrat yang diperoleh dari 3 kali proses maserasi dikumpulkan menjadi satu dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga diperoleh ekstrak kasar *Chlorella sp.* fraksi metanol. Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dimasukkan ke dalam wadah yang telah diketahui massanya dan ditimbang sambil dialiri gas N<sub>2</sub> dan dihitung rendemennya dengan persamaan :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

#### 2) Hidrolisis dilanjutkan partisi dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter

Sebagian ekstrak pekat dihidrolisis dengan menambahkan 5 mL asam klorida (HCl) 2 N selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu 40 °C lalu didinginkan (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat sampai PH-nya netral, lalu hidrolisat diekstrak dengan pelarut etil asetat. Tahap yang sama dilakukan dengan pelarut petroleum eter. Ekstrak yang diperoleh dari masing-masing pelarut dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya, setelah didapatkan rendemen untuk masing-masing fraksi diidentifikasi dan dipisahkan kandungan senyawa steroidnya..

#### **3.4.4 Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Uji Reagen**

Fraksi etil asetat dan petroleum eter *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambah dengan 1 - 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

#### **3.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis**

Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan KLT preparatif menggunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 20 x10 cm<sup>2</sup>. Sebanyak 0,01 gram fraksi hidrolisis dilarutkan dalam 2,5 mL pelarutnya, kemudian sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing spot.

Noda yang berbentuk pita dihitung Rfnya dan dibandingkan dengan Rf hasil KLTA. Noda yang diduga merupakan senyawa golongan steroid dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarut pelarutnya selanjutnya disentrifugasi untuk mengendapkan silikanya, hingga endapan silika berwarna putih. Masing-masing supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan gas N<sub>2</sub> hingga pelarut habis menguap sehingga diperoleh isolat pekat dari masing-masing noda. Hasil isolat dari KLTP dicek dengan KLTA menggunakan eluen yang terbaik hasil KLTA dan eluen yang berbeda yaitu n-heksana:etil asetat (4:1) (Hidayah, dkk., 2015; Imamah, dkk., 2015 dan Reveny, 2008).

#### **3.4.6 Uji toksisitas dengan Menggunakan Larva Udang *Artemia salina*;**

Uji toksisitas dilakukan pada isolate hasil KLTP sebagai perlakuan, pelarut sebagai kontrol negatif dan media sebagai kontrol positif. Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Isolate ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL sehingga diperoleh larutan stok 1.000 ppm.

Dipipet larutan stok 1000 ppm sebanyak 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, dan 250 µL. Setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut dimasukkan ke dalam botol vial, kemudian dikocok sampai dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan air laut hingga tanda batas, sehingga konsentrasi masing-masing menjadi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Kemudian dipindahkan kembali ke dalam botol vial dengan volume tertentu. Larva udang *Artemia salina* L sebanyak 10 ekor dimasukkan dalam botol vial dan ditutup dengan aluminium foil, lalu diletakkan di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati terhadap kematian larva udang. Selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai  $LC_{50}$  dengan analisis probit.

#### 3.4.7 Uji aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

Disiapkan sepuluh tabung reaksi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi larutan sampel sebanyak 4,5 mL dan ditambahkan DPPH 1,0 mM sebanyak 1,5 mL (perbandingan DPPH : ekstrak 1:3). Tabung reaksi ditutup dengan tissue dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{maks}$  yang didapatkan sebelumnya. Data absorbansi yang diperoleh dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya.

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left( \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Sampel dilarutkan dalam pelarutnya dengan konsentrasi 5, 25, 50, 100 dan 200 ppm. Disiapkan tiga tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi diisi dengan 4,5 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH 1,0 mM sebanyak 1,5 mL. Campuran diinkubasi dengan suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data absorbansinya yang diperoleh dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya. Setelah didapatkan persen (%) aktivitas antioksidannya, selanjutnya masing-masing ekstrak dihitung nilai  $EC_{50}$  nya dengan memperoleh persamaan regresi.

### **3.4.8 Identifikasi Isolat Hasil KLTP**

#### **3.4.8.1 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis**

Masing-masing sampel murni yang diperoleh dari pemisahan dan pemurnian secara kromatografi kemudian dilarutkan dengan pelarut petroleum eter (PE) dan etil asetat hingga 9 mL. Selanjutnya dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya dan dianalisis pada panjang rentang gelombang 200 – 800nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sehingga akan diperoleh spektrum dan panjang gelombang maksimum

#### **3.4.8.2 Identifikasi dengan Spektrofotometer FTIR**

Isolat hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis merk *Varian Carry* pada panjang gelombang 200-800 nm serta spektrofotometer Infra Merah merk varian tipe FT 1000. Pada FTIR isolat ditetaskan pada pellet KBr, dikeringkan kemudian dianalisis dengan spektrofotometer Infra Merah merk varian tipe FT 1000 pada rentang bilangan gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.4.8.3 Identifikasi dengan LC-MS**

Sampel dilarutkan dengan pelarutnya kemudian diinjeksi ke dalam LC-MS sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Fase gerak yang digunakan menggunakan sistem gradien dengan pelarut A (terdiri dari asam asetat 0,01 % dalam  $\text{H}_2\text{O}$ ) dan pelarut B (terdiri dari asam asetat 0,01 % dalam asetonitril) dengan kecepatan alir 300  $\mu\text{L}/\text{menit}$ . Gradien pelarut menggunakan perbandingan 0 % A : 100 % B dan 100 % A : 0 % B selama 5 menit. Kolom yang digunakan adalah Hypersil Gold C-18 (1,9  $\mu\text{m}$  x 2,1 mm x 50 mm). Temperatur kolom yang digunakan yaitu 30  $^{\circ}\text{C}$  selama running. Penggunaan MS (*Mass Spektrometer*) TSQ QUANTUM ACCES MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dengan arus 4  $\mu\text{A}$  (Diaz, *et al.*, 2007).

### 3.4.9 ANALISIS DATA

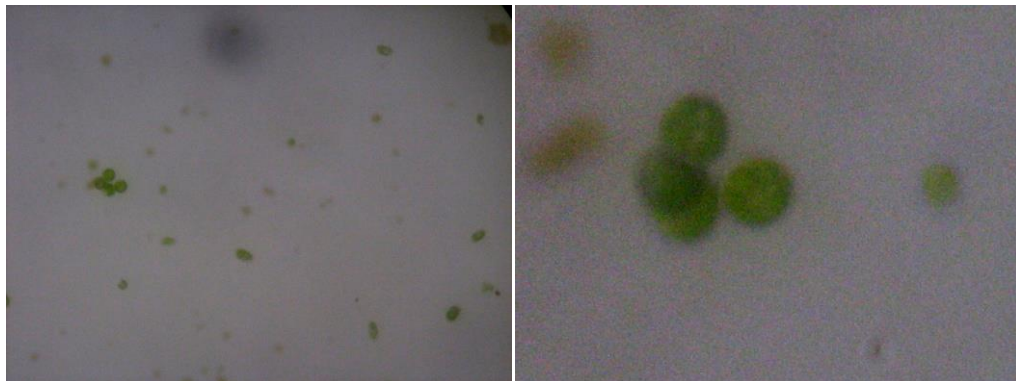
- 1) Uji Toksisitas: data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat toksisitas dapat diketahui dengan melakukan uji  $LC_{50}$  menggunakan analisis probit menggunakan program MINITAB 14 dengan tingkat kepercayaan 95 %.
- 2) Uji Aktivitas Antioksidan: menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing ekstrak dan pembanding asam askorbat (vitamin C) dan BHT, kemudian dilakukan perhitungan nilai  $EC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y) menggunakan *software “GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data”*. Dibandingkan nilai  $EC_{50}$  pada masing-masing sampel. Sampel yang mempunyai nilai  $EC_{50}$  terendah menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi. Selanjutnya, membandingkan nilai  $EC_{50}$  pada masing-masing sampel dengan pembanding untuk mengetahui aktivitas antioksidan alami dengan antioksidan sintetik.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya adalah (1) kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* (2) Preparasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* (3) Ekstraksi komponen aktif mikroalga *Chlorella sp.* dengan maserasi menggunakan pelarut metanol dilanjutkan dengan hidrolisis dan partisi menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter (4) Uji reagen untuk memastikan adanya golongan senyawa steroid (5) Pemisahan senyawa Steroid dengan menggunakan KLT, (6) Uji Toksisitas dengan metode BSLT, (7) Uji aktivitas antioksidan dengan metod DPPH dan (8) Identifikasi isolat KLT preparatif dengan UV-Vis, FTIR dan LC-MS.

Sampel utama dalam penelitian ini adalah mikroalga *Chlorella sp.* yang merupakan hasil dari kultivasi. Uji taksonomi *Chlorella sp.* telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini memiliki ciri-ciri yaitu sel berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-8  $\mu\text{m}$  dan berwarna hijau, Berdasarkan ciri-ciri tersebut dapat disimpulkan bahwa sampel ini identik dengan marga *Chlorella* atau jenis *Chlorella sp.* Hal ini sesuai dengan ciri-ciri yang disebutkan oleh Sidabutar (1999) bahwa *Chlorella sp.* merupakan mikroalga hijau bersel tunggal, mempunyai sel bentuk bulat dengan diameter 2-8  $\mu\text{m}$ , hidup menyendiri atau berkelompok. Bentuk sel *Chlorella sp.* tersaji pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1 Mikroalga *Chlorella sp.* Pada uji taksonomi**

(a) Perbesaran 10 x (b) Perbesaran 100 x

#### 4.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)

Kultivasi *Chlorella sp.* dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) menggunakan erlenmeyer 1000 mL. MET merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga. MET mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Unsur hara yang terkandung dalam MET seperti K, P, Fe, Na, dan K, sedangkan vitamin yang terkandung dalam media tersebut diantaranya karoten, thiamin, riboflavin, niasin, dan vitamin C. Media kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %. Ekstrak tauge yang berwarna bening kekuningan dan agak kental diencerkan dengan aquades hingga diperoleh MET 4 %. Hasil MET 4 % diperoleh berwarna bening agak kekuningan dan encer.



**Gambar 4.2. MET 4 %**

*Chlorella sp.* dikultur dalam MET dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Cahaya mempunyai peranan yaitu sebagai sumber energi dalam proses fotosintesis. Penyinaran dengan lampu TL selama kultur digunakan sebagai pengganti cahaya matahari agar sel *Chlorella sp.* dapat melakukan proses fotosintesis. Temperatur selama kultivasi *Chlorella sp.* menggunakan temperatur ruang (biasanya berkisar antara temperatur 25–30 °C). Kondisi temperatur tersebut merupakan kisaran temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga termasuk *Chlorella sp.* karena untuk pertumbuhan mikroalga yang optimal digunakan temperatur 15–30 °C. Derajat keasaman (pH) pada kultur *Chlorella sp.* selama kultivasi berkisar 7–7,2. Kisaran pH ini berada pada kisaran pH yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga yaitu 4,5–9,3.

Kultivasi dilakukan terhadap isolate murni *Chlorella sp.* yang berumur 6 – 7 hari. Pada hari tersebut merupakan fase eksponensial dimana *Chlorella sp.* mengalami pembelahan aktif karena tersedianya nutrisi dan pencahayaan yang cukup baik sehingga proses pertumbuhannya maksimal (Khamidah, dkk., 2014). *Chlorella sp.* dikultivasi dalam MET 4 % dengan diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas pengaturan 14 jam terang dan 10 jam gelap yang dianalogikan sebagai pengganti sinar matahari dalam proses fotosintesis.

Selama proses kultivasi, kultur *Chlorella sp.* mengalami perubahan warna. Hal ini menunjukkan bahwa kepadatan sel *Chlorella sp.* juga mengalami perubahan. Warna hijau pada *Chlorella sp.* ditimbulkan oleh pigmen yang terkandung di dalam sel *Chlorella sp.* Sel *Chlorella sp.* mengandung pigmen berupa karoten, xanthofil, serta klorofil a dan b dalam jumlah yang besar (Volesky, 1970 dalam Rostini, 2007). Selama proses kultivasi jumlah sel *Chlorella sp.* terus mengalami peningkatan. Hal ini menyebabkan klorofilnya juga meningkat sehingga pigmen hijau yang ditimbulkan juga semakin pekat.



**Gambar 4.3. Perubahan warna kultur *Chlorella sp.* hari ke 0-10**

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk mengumpulkan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang akan digunakan sebagai sampel dan uji golongan senyawa aktif. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 dari proses kultivasi yang merupakan fase stasioner dari mikroalga *Chlorella sp.*

Fase stasioner merupakan tahap pertumbuhan yang konstan dimana laju reproduksi sama dengan laju kematian (Yudha, 2008). Fase stasioner terjadi karena nutrisi dalam media sudah sangat berkurang sehingga tidak mencukupi untuk pertumbuhan dan pembelahan sel. Setelah fase stasioner kepadatan sel



mengalami penurunan yang menandakan kultur telah memasuki fase kematian (Prihantini, 2005). Menurut Pelczar dan Chan (1986), pada fase stasioner terjadi metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer.

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner berdasarkan Khamidah (2013) yang menyebutkan bahwa kurva pertumbuhan dari *Chlorella sp.* dalam medium ekstrak taube (MET) menunjukkan fase stasioner pada hari ke-10 mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar  $4,88 \times 10^6$  sel/mL.

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara endapan mikroalga *Chlorella sp.* yang dihasilkan pada saat kultivasi dikumpulkan menjadi satu kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit sehingga terpisah antara filtrat dengan biomassa. Biomassa yang terpisah dikumpulkan menjadi satu. Hasil pemanenan yang diperoleh berupa biomassa *Chlorella sp.* berwarna hijau tua dengan tekstur yang masih berair, seperti pada Gambar 4.4.



**Gambar 4.4 Biomassa *Chlorella sp.* hasil Kultivasi**  
sebelum disentrifuge (kiri) dan setelah disentrifuge (kanan).

Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* basah yang diperoleh dari hasil panen pada penelitian ini sebesar 2.442,84 g. Biomassa yang terkumpul dimungkinkan masih mengandung air, sehingga perlu dilakukan preparasi sampel mikroalga *Chlorella sp.* sebelum dilanjutkan ke perlakuan berikutnya.

#### 4.2 Preparasi Sampel Biomassa *Chlorella sp.*

Preparasi sampel biomassa mikrolaga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara pengeringanginan selama  $\pm 12$  jam menggunakan kipas angin. Pengeringan tidak dilakukan dengan menggunakan oven karena dikhawatirkan pengovenan pada suhu tinggi dapat merusak senyawa aktif yang terkandung di dalam biomassa *Chlorella sp.* Menurut Robinson (1995) dalam Daniel (2010), beberapa metabolit sekunder mudah rusak pada suhu tinggi. Uma, *et al.*, (2011) menyebutkan bahwa *Chlorella* mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, terpenoid, tanin, saponin dan senyawa fenolik. Umumnya metabolit sekunder memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi. Hartika (2009) menyebutkan bahwa sistem aromatik terkonjugasi mudah untuk rusak pada suhu tinggi.

Preparasi sampel dengan cara pengeringanginan bertujuan untuk mengurangi kadar air pada sampel biomassa *Chlorella sp.* Hal ini dilakukan agar kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dapat diminimalkan serta mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia di dalamnya. Menurut Puspita (2009) mikroorganisme dapat tumbuh dengan kadar air lebih dari 10 % yang akan mempengaruhi reaksi enzimatik sehingga mempercepat proses pembusukan. Apabila kandungan air dalam sampel kurang dari 10 % maka kestabilan optimum akan tercapai dan pertumbuhan mikroba akan dapat dikurangi.

Sampel mikroalga *Chlorella sp.* yang telah kering dikerok sehingga berbentuk serbuk berwarna hijau tua. Serbuk mikroalga *Chlorella sp.* kemudian dihaluskan dengan mortar dan alu untuk memperluas luas permukaan sehingga memperbesar kontak antara sampel dan pelarut saat proses ekstraksi. Menurut Oktavia (2009) menyatakan bahwa serbuk dengan tingkat penghalusan yang tinggi memungkinkan terjadinya kerusakan sel-sel semakin besar sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut.

Hasil yang diperoleh dari proses pengeringan biomassa *Chlorella sp.* adalah 32,64 gram biomassa kering dari total 2.442,84 gram biomassa basah. Rendemen biomassa mikroalga *Chlorella sp.* setelah pengeringanginan selama 5 – 7 hari adalah sebesar 1,34 %.



**Gambar 4.5. *Chlorell sp.* hasil pengeringan dan padatan berupa serbuk**

Langkah selanjutnya adalah analisis kadar air. Analisis kadar air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar air dalam sampel kering mikroalga *Chlorella sp.*. Kadar air yang terkandung dalam sampel dapat mempengaruhi proses ketahanan sampel saat proses penyimpanan. Sampel dengan kadar air yang rendah dapat mencegah tumbuhnya mikroorganisme saat penyimpanan seperti jamur, sehingga mikroorganisme tidak dapat mendegradasi senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* dan dapat disimpan lebih lama (pengawetan) (Hayati, dkk., 2012). Selain itu, penentuan kadar air juga diperuntukkan untuk mengetahui apakah sampel sudah memenuhi syarat untuk proses ekstraksi.

Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode *thermografimetri*, yaitu dengan prinsip penghilangan kadar air dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 100 – 105 °C. Perlakuan seperti ini dilakukan berulang-ulang sampai mencapai berat konstan. Banyaknya kandungan air yang telah diuapkan dinyatakan dengan selisih berat sampel sebelum dan sesudah dioven.

Pengujian kadar air dalam mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh 10,4783 %. Nilai ini sudah di bawah kadar air maksimum yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan dengan lancar. Menurut Setyowati (2009) dalam Setyaningsih (2013) proses ekstraksi maksimum kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan dengan lancar yaitu sebesar 11 %.

#### **4.3 Isolasi Komponen Aktif Mikroalga *Chlorella sp.***

##### **4.3.1 Ekstraksi Maserasi Biomassa *Chlorella sp.***

Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi. Maserasi yaitu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan. Menurut Lenny (2006), ekstraksi beberapa senyawa metabolit sekunder dari alga menggunakan ekstraksi maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam alga dalam pelarut.

Ekstraksi maserasi pada mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan pelarut metanol p.a perbandingan 1:5. Metanol digunakan karena kebanyakan senyawa aktif metaboli tsekunder yang terdapat di alam masih terikat dalam bentuk glikosidannya sehingga digunakan pelarut polar seperti metanol. Penggunaan metanol bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang bersifat polar di dalam mikroalga *Chlorella sp.*, sebagaimana prinsip *like dissolves like* yaitu senyawa akan larut ke dalam pelarut yang memiliki kepolaran yang hamper sama.

Proses maserasi dilakukan sampai filtrat dari mikroalga *Chlorella sp.* yang awalnya berwarna hijau kehitaman berubah menjadi lebih terang dan sampel berwarna hijau pucat. Hal ini diasumsikan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* sudah terekstrak secara maksimal. Filtrat yang dihasilkan di saring dengan kertas saring menggunakan corong *buchner* dan dikumpulkan menjadi satu. Filtrat hasil penyaringan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* untuk menguapkan pelarutnya. Proses ini dihentikan ketika tidak ada pelarut lagi yang menetes pada *receiving part* yang diasumsikan bahwa pada sampel yang terdapat pada labu alas bulat sudah tidak mengandung pelarut sehingga didapatkan sampel ekstrak metanol pekat mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* dialiri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang masih terdapat pada sampel. Pengaliran gas N<sub>2</sub> dihentikan sampai diperoleh berat ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* telah konstan. Ekstrak *Chlorella sp.* diperoleh dalam bentuk padatan pekat berwarna hijau tua dan pekat. Menurut Sriwardani (2000) ekstrak metanol mikrolga *Chlorella sp.* berwarna hijau tua dan pekat. Hal ini diduga karena kandungan

klorofil yang terdapat pada mikroalga *Chlorella sp.* bersifat polar, sehingga saat maserasi klorofil kontak dengan metanol dan ikut terekstrak.

Ekstrak metanol yang diperoleh berupa ekstrak kental berwarna hijau tua. Rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.***

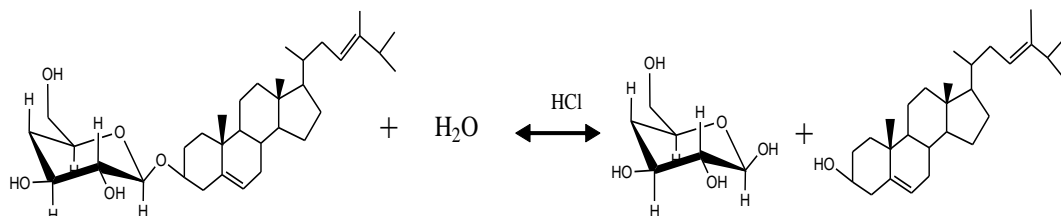
Pelarut	Berat biomassa (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%) (b/b)	Warna Ekstrak Pekat
Metanol	32,64	6,57	20,13	Hijau tua pekat

#### 4.3.2 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Kebanyakan metabolit sekunder di alam berupa glikosida (mengandung komponen gula dan bukan gula). Komponen gula disebut glikon dan komponen bukan gulanya merupakan metabolit sekunder yang disebut aglikon. Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan reaksi hidrolisis. Prinsip hidrolisis asam adalah peruraian suatu senyawa dengan cara memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis asam.

Hidrolisis ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menambahkan larutan HCl 2 N pada ekstrak pekat. Tujuan penambahan HCl 2 N adalah sebagai katalis asam yang digunakan untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida antara senyawa glikon (gula) dan aglikon (bukan gula). Pemilihan HCl sebagai katalis pada proses hidrolisis karena HCl merupakan asam kuat dimana asam kuat akan terionisasi secara sempurna di dalam air. Menurut Handoko (2006) menyebutkan bahwa asam kuat lebih mudah melepas ion  $H^+$  secara sempurna di dalam air. Konsentrasi ion  $H^+$  inilah yang mempengaruhi kecepatan reaksi pemutusan ikatan glikosida. Pemilihan HCl sebagai katalis karena sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Penetralan bertujuan menghentikan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (dapat balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Penambahan natrium bikarbonat bertujuan untuk menetralkan suasana larutan yang menjadi asam setelah penambahan larutan HCl 2 N.

Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida yang terjadi ketika penambahan larutan HCl ditunjukkan pada Gambar 4.6.



**Gambar 4.6 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan *O*-glikosida**

Selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Pemilihan pelarut ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar dapat terekstrak. Pada proses ini terdapat dua lapisan yang tidak saling bercampur, dan diduga pelarut yang bersifat polar (fase air) akan mengekstrak komponen karbohidrat (glikon), sedangkan pelarut semi polar maupun non polar (fase organik) akan mengekstrak metabolit sekunder (aglikon) yang sudah terpisah dengan komponen gula yang diduga aktif sebagai antioksidan maupun antibakteri.

Ekstrak hasil hidrolisis dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga pelarut hampir teruapkan semua, kemudian ekstrak pekat dialiri gas  $N_2$  dan dihitung rendemennya. Rendemen ekstrak petroleum eter disajikan pada Tabel 4.2.

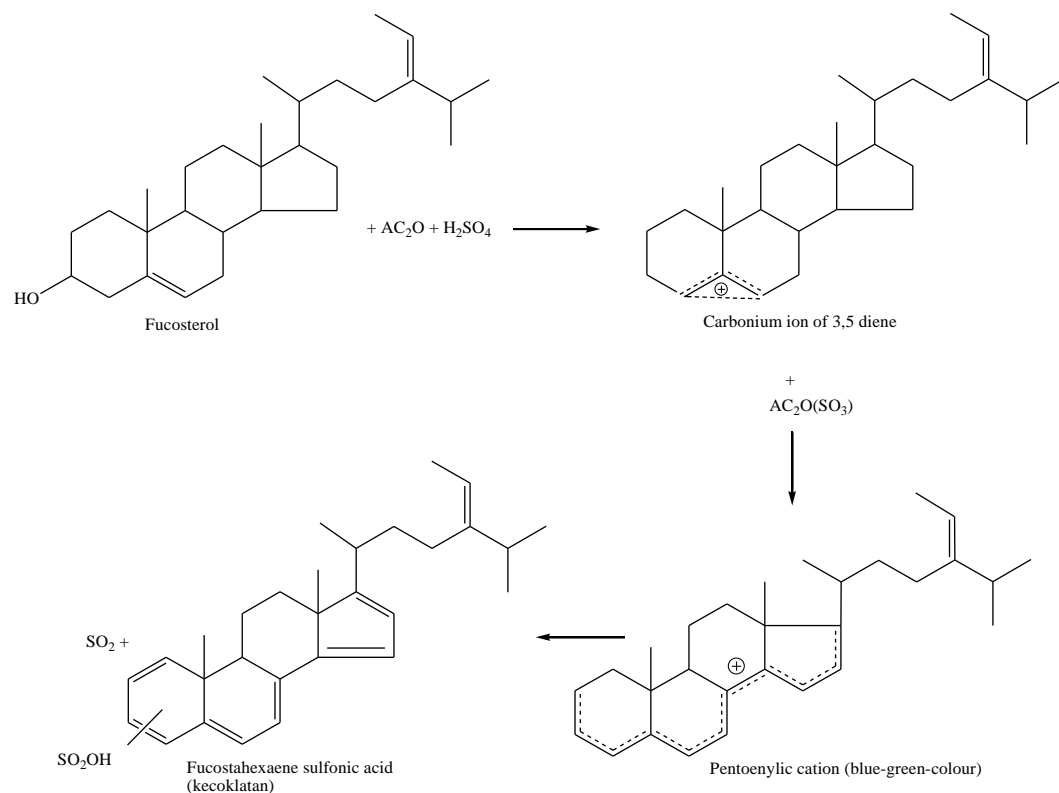
**Tabel 4.2 Hasil ekstraksi dan rendemen hasil hidrolisis**

Pelarut	Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Rendemen(%)
Petroleum eter	Hijau tua	Hijau kehitaman	80,95
Etil asetat	Hijau pucat	Hijau kehitaman	50,63

Rendemen yang dihasilkan dari variasi kedua pelarut memiliki hasil yang berbeda, pelarut etil asetat memiliki rendemen lebih tinggi yaitu 80,95 %. Berdasarkan kedua rendemen yang dihasilkan masing-masing fraksi, memberikan informasi bahwa sebagian besar metabolit sekunder lebih terekstrak ke dalam pelarut etil asetat dibandingkan dengan petroleum eter.

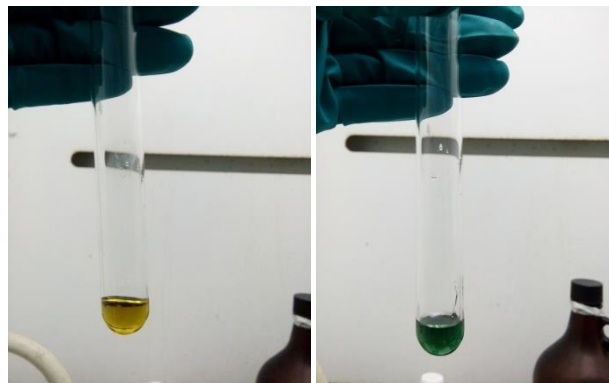
#### 4.4 Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Uji Reagen

Uji reagen atau uji fitokimia merupakan uji kualitatif yang dilakukan untuk mengidentifikasi adanya senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.*. Pada penelitian ini, identifikasi menggunakan reagen Liebermann-Burchard (Sukadana, 2011). Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid (Hayati dan Nur, 2010). Perubahan warna disebabkan karena terjadi reaksi oksidasi melalui pembentukan poliena terkonjugasi (ikatan rangkap terkonjugasi) sehingga memiliki panjang gelombang pada daerah visibel (sinar tampak). Dugaan reaksi steroid dengan reagen Liebermann-Burchard ditunjukkan pada Gambar 4.7.



**Gambar 4.7** Dugaan reaksi fucosterol dengan reagen Liebermann- Burchard

Hasil uji fitokimia terhadap fraksi etil asetat dan petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan adanya kandungan senyawa steroid yang ditandai perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada larutannya.



Sebelum

Sesudah

**Gambar 4.8. Hasil Uji Fitokimia**

#### **4.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode kromatografi cair yang sederhana yang mampu memisahkan senyawa-senyawa yang berbeda seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintetis. Prinsipnya yaitu pemisahan suatu senyawa didasarkan pada perbedaan distribusi diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak.

Pemurnian senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan metode KLTP. Fase diam yang digunakan dalam pemisahan senyawa steroid adalah plat silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>. Plat terbuat dari gypsum dengan ukuran pori-pori 60 Å dengan kemampuan berfluoresensi pada panjang gelombang minimal 254 nm. Plat KLT silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> yang berukuran 10x20 cm.

Fase gerak dalam KLT preparatif adalah campuran dua pelarut organik terbaik yang telah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Eluen n-heksana:etil asetat (4:1) sebagai fase gerak yang merupakan eluen terbaik pemisahan steroid pada mikroalga *Chlorella sp.*. Imamah, dkk., (2015) yang telah melakukan 5 variasi eluen untuk pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* membuktikan bahwa eluen n-heksana:etil asetat (4:1) merupakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik dengan menghasilkan 12 noda pada plat KLTA, sedangkan hasil KLT preparatif diperoleh

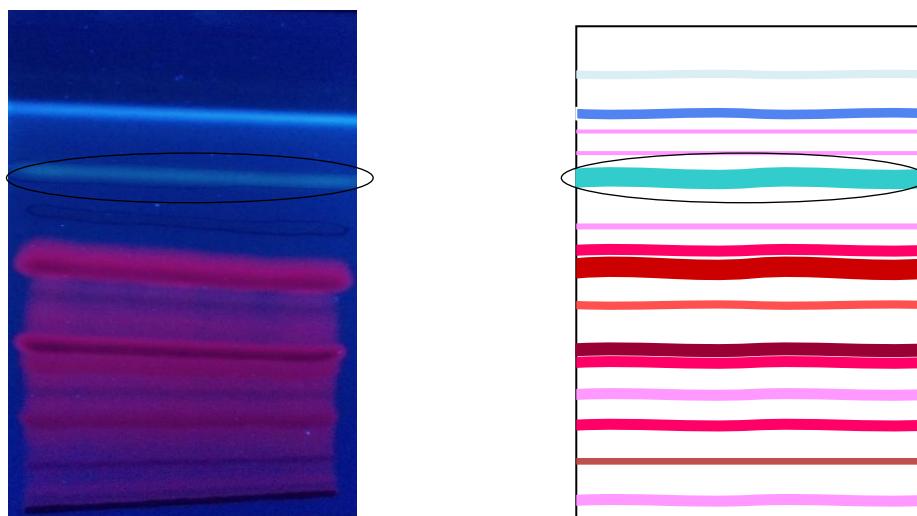


10 noda. Dihasilkan 1 spot steroid pada noda ke 9. Hasil uji kemurnian senyawa steroid pada menggunakan KLT dua dimensi menunjukkan bahwa pada elusi menggunakan eluen yang pertama (n-heksana:etil asetat (4:1)) dan kedua (benzena:etil asetat (3:2)) menghasilkan 1 noda berwarna hijau. Marlina (2007) melakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat (4:1) memberikan hasil positif terhadap senyawa steroid.

Plat yang digunakan pada KLT Preparatif sebelumnya diaktivasi dengan dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan kadar air pada plat (Sastroamidjojo, 2007). Ekstrak hasil partisi dilarutkan dengan petroleum eter hingga konsentrasi 10.000 ppm dan ditotolkan sepanjang plat KLT sebanyak 7 totolan pada jarak 1 cm dari bawah, sisi kanan dan sisi kiri menggunakan pipa kapiler. Sebelum dilakukan proses elusidasi senyawa, terlebih dahulu dilakukan penjenjuran eluen selama  $\pm$  1 jam untuk menjenuhkan uap eluen dalam bejana agar campuran eluen dapat mengelusi ekstrak secara maksimal dan cepat. Spot yang terbentuk selanjutnya dapat dilihat menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

#### **4.4.5.1 Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat**

Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi etil asetat dengan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) disajikan pada Gambar 4.8 dan Tabel 4.3. Senyawa yang memiliki R<sub>f</sub> rendah bersifat lebih polar karena tertahan oleh fase diamnya yang merupakan silika gel yang bersifat polar dari eluen. Sedangkan noda yang memiliki R<sub>f</sub> yang lebih tinggi bersifat kurang polar karena cenderung terikat pada fase geraknya sebagaimana prinsip *like dissolves like*. Pereaksi uji yang umum digunakan untuk steroid adalah reaksi *Lieberman – Burchard* dengan memberikan warna hijau – biru (Harborne, 1987). Hal tersebut didukung dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) yang menunjukkan bahwa warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid yang diperkuat dengan penentuan struktur isolat menggunakan UV-Vis, IR dan MS.



**Gambar 4.9 Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan KLT Preparatif pada sinar UV  $\lambda$  366 nm**

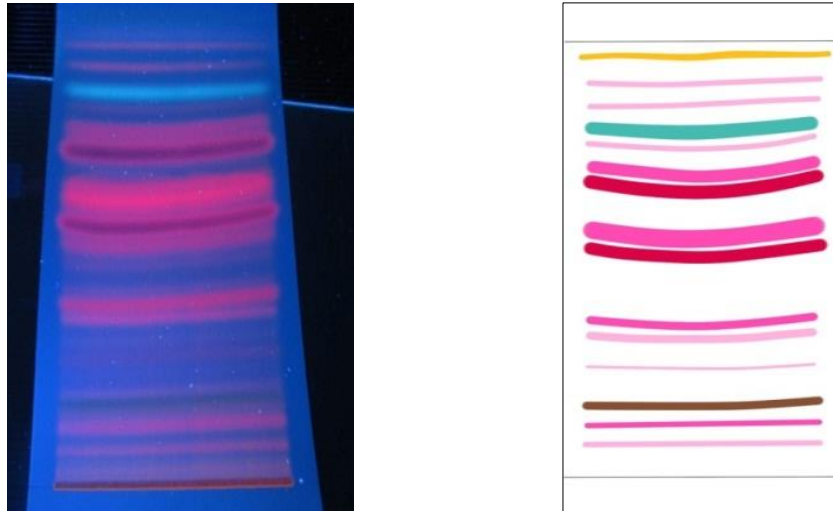
**Tabel 4.1 Hasil KLT Preparatif senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (4:1) pada sinar UV  $\lambda$  366 nm**

No.	Nilai Rf	Warna noda	Dugaan senyawa
1.	0,0389	Merah muda	-
2.	0,0889	Ungu kecoklatan	-
3.	0,1805	Merah muda menyala	-
4.	0,2361	Merah muda	-
5.	0,2944	Merah muda menyala	-
6.	0,3389	Merah kehitaman	-
7.	0,4389	Merah muda	-
8.	0,5	Ungu kemerahan	-
9.	0,2056	Merah muda menyala	-
10.	0,6162	Merah muda	-
11.	0,7222	Hijau kebiruan	Steroid
12.	0,7556	Merah muda	-
13.	0,8056	Merah muda	-
14.	0,8472	Biru terang	-
15.	0,9056	Biru	-

Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT preparatif pada penelitian ini diperoleh 15 noda. Noda yang dihasilkan pada plat KLT dideteksi dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Noda ke 11 berwarna hijau kebiruan yang diduga merupakan senyawa steroid dengan Rf 0,7222.

#### 4.4.5.2 Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter

Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter dengan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) disajikan pada Gambar 4.9 dan Tabel 4.4.



**Gambar 4.9 Hasil KLT Preparatif fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana dan etil asetat (4:1)**

Berdasarkan Gambar 4.9 pemisahan senyawa pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana dan etil asetat (8:2) menghasilkan 15 noda. Hasil noda ke-4 diduga merupakan senyawa steroid dimana noda tersebut menghasilkan warna hijau kebiruan ketika dideteksi dibawah lampu UV 366 nm. Warna yang dihasilkan jelas dan memiliki jarak dengan noda lainnya sehingga mudah untuk dikerok. Penampakan noda hijau kebiruan pada sinar UV 366 nm disebabkan karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang terdapat pada noda tersebut sehingga noda akan berfluoresensi. Fluoresensi warna yang tampak tersebut merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi tinggi. Perbedaan energi emisi yang dipancarkan pada saat kembali ke energi dasar inilah yang menyebabkan perbedaan fluoresensi warna yang dihasilkan oleh tiap noda (Rohman dan Gandjar, 2007).

**Tabel 4.4 Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (8:2) dideteksi dibawah lampu UV  $\lambda$  366 nm**

No	Warna noda di bawah sinar UV pada $\lambda$ 366 nm	Nilai Rf	Dugaan Senyawa
1	Jingga	0,9638	-
2	Merah muda	0,8944	-
3	Merah muda	0,8388	-
4	Hijau kebiruan	0,7777	Steroid
5	Merah muda	0,7388	-
6	Merah muda menyala	0,6777	-
7	Merah hitam	0,6333	-
8	Merah muda menyala	0,5555	-
9	Merah hitam	0,4777	-
10	Merah muda menyala	0,3194	-
11	Merah muda	0,2888	-
12	Merah muda	0,2222	-
13	Coklat	0,1388	-
14	Merah muda menyala	0,0972	-
15	Merah muda	0,0583	-

Senyawa steroid ditunjukkan pada noda ke-4 yang bersifat non polar karena lebih tertarik pada eluen yang bersifat kurang polar dari fase diamnya. Isolat ke-4 diduga mengandung senyawa steroid yang berwarna hijau kebiruan.

Spot no. 4 tersebut selanjutnya dikerok dan dilarutkan menggunakan pelarut petroleum eter dilanjutkan pelarut etil asetat. Penggunaan 2 pelarut tersebut bertujuan untuk memaksimalkan pelarutan senyawa yang mungkin tertinggal di silika. selanjutnya campuran hasil kerokan dan pelarut divortex untuk menghomogenkan larutan sebelum disentrifugasi. Campuran disentrifuge pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan silika sehingga supernatan yang diambil tidak bercampur dengan silika dan bisa untuk didekantasi. Supernatan yang diperoleh berupa larutan bening yang diduga mengandung senyawa steroid terlarut. Supernatan yang telah terpisah dari silika kemudian diuapkan pelarutnya hingga kering sehingga yang didapat adalah senyawa steroid. KLT preparatif dilakukan sampai 4 kali untuk memperoleh senyawa steroid yang lebih banyak.

#### **4.6 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang *Artemia salina* L.**

Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji dalam penelitian ini adalah *brine shrimp* (Lenny, 2006). Mortalitas *in vitro* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologis suatu senyawa pada *Artemia Salina* L. adalah kematiannya (Meyer, *et al.*, 1982).

##### **4.6.1 Penetasan Larva**

*Artemia salina* Leach. yang digunakan untuk pengujian toksisitas tersedia dalam bentuk telur. Sehingga, sebelum digunakan untuk pengujian, terlebih dahulu dilakukan penetasan telur dalam air laut dengan pencahayaan dan aerasi selama 48 jam. Fungsi dari pencahayaan adalah untuk memberikan rangsangan terhadap *Artemia* untuk menetas karena *Artemia* termasuk dalam organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013). Sedangkan, fungsi dari aerasi adalah untuk memberikan oksigen yang cukup dalam kelangsungan hidup *Artemia*.

Mekanisme penetasan larva *Artemia salina* Leach. melalui beberapa tahapan yaitu tahap hidrasi, pecahnya cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga telur yang diawetkan dalam bentuk kering akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Selanjutnya tahap pecahnya cangkang yang diikuti tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum naupli (larva) keluar dari cangkang (Sriwahyuni, 2010).

Larva udang *Artemia salina* L. yang baru menetas berwarna kemerah-merahan dan masih mengandung cadangan makanan. Sehingga, *Artemia* dapat bertahan hidup selama  $\pm 2$  hari setelah menetas tanpa diberi makanan. Setelah  $\pm 2$  hari, cadangan makanan larva habis karena seiring dengan itu, larva mempunyai mulut, saluran pencernaan dan dubur. Oleh sebab itu, larva mulai membutuhkan makanan untuk kelangsungan hidupnya. Makanan larva *artemia* berupa larutan ragi roti yang dibuat dengan takaran setiap 3 mg ragi dalam 5 mL aquades (Amaliyah, dkk., 2013).

Larva *Artemia* yang digunakan untuk pengujian toksisitas adalah *Artemia* dengan umur 48 jam. Hal ini dikarenakan pada umur 48 jam larva berada dalam keadaan paling peka. Organ-organ pada *Artemia* sudah terbentuk lengkap, salah satunya adalah terbentuknya mulut. Dengan terbentuknya mulut, *Artemia* dapat meminum air laut yang mengandung senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.*

#### **4.6.2 Uji Toksisitas**

Uji toksisitas dengan metode BSLT merupakan salah satu metode untuk menguji sifat toksik dari suatu senyawa menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach. Prosedurnya dengan menentukan nilai  $LC_{50}$  dari aktivitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Suatu senyawa dikatakan bersifat toksik jika harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  (Meyer, *et al.*, 1982) yaitu konsentrasi dimana suatu senyawa dapat menyebabkan terjadinya 50 % kematian hewan uji larva *Artemia salina* Leach. Menurut Lisdawati (2002) nilai  $LC_{50} < 30 \text{ ppm}$  memiliki potensi aktivitas sebagai antitumor atau antikanker yang bersifat sitotoksik. Meskipun uji toksisitas dengan BSLT tidak dapat secara langsung menggambarkan kemampuan toksiknya terhadap sel kanker tertentu, namun metode ini telah banyak dilaporkan bermanfaat untuk uji skrining senyawa aktif antikanker.

Pengujian dilakukan terhadap ekstrak metanol, fraksi etil asetat, petroleum eter dan isolat senyawa steroid hasil KLT preparative dari fraksi etil asetat dan petroleum eter. Masing-masing sampel uji dibuat dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm serta sebagai kontrolnya 0 ppm yaitu pelarutnya tanpa sampel dan DMSO dan kontrol DMSO. DMSO digunakan sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan ekstrak dalam air laut. DMSO memiliki struktur yang terdiri atas gugus  $\text{S=O}$  yang bersifat polar dan dua alkil ( $-\text{CH}_3$ ) yang bersifat kurang polar. Gugus polar akan melarutkan air laut sedangkan gugus yang kurang polar akan melarutkan ekstrak yang kurang polar. Sepuluh larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji dalam setiap konsentrasi masing-masing perlakuan dan masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan nilai yang sering muncul (modus) dinyatakan sebagai banyaknya larva yang mati.

Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid hasil KLTP disajikan dalam Tabel 4.5 dan 4.6.

**Tabel 4.5 Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan etil asetat serta isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.***

Konsentrasi (ppm)	Modus larva yang mati (ekor)				
	Ekstrak metanol	Fraksi PE	Isolat Fraksi PE	Fraksi Etil Asetat	Isolat Fraksi EA
0*	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
5	1	1	2	2	4
10	1	1	3	3	3
15	1	1	3	4	5
20	1	2	4	5	8
25	2	3	6	3	7

Keterangan : Jumlah total hewan uji 30 ekor *Artemia salina* Leach

0 : kontrol pelarut tanpa sampel dan DMSO

0\* : kontrol DMSO tanpa sampel dan pelarut

Data kematian hewan uji pada Tabel 4.6 digunakan untuk menghitung persen mortalitas. Data mortalitas dibutuhkan untuk menghitung nilai  $LC_{50}$  dari sampel isolat yang diuji. Kematian larva ditunjukkan dengan parameter *Lethal Concentration 50* ( $LC_{50}$ ) yang mengindikasikan tingkat toksisitas senyawa. Semakin kecil nilai  $LC_{50}$  menunjukkan semakin besar daya mortalitas sampel terhadap hewan uji.

**Tabel 4.6 Mortalitas ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan etil asetat serta isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.***

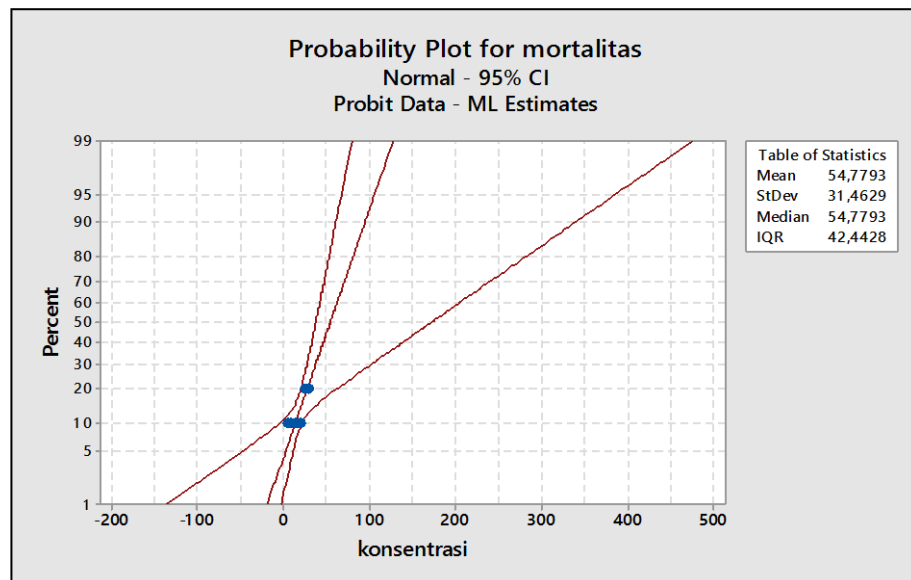
Konsentrasi (ppm)	Modus larva yang mati (ekor)				
	Ekstrak metanol	Fraksi PE	Isolat Fraksi PE	Fraksi Etil Asetat	Isolat Fraksi EA
0*	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
5	10	10	20	20	40
10	10	10	30	30	30
15	10	10	30	40	50
20	10	20	40	50	80
25	20	30	60	30	70

Keterangan : Jumlah total hewan uji 30 ekor *Artemia salina* Leach

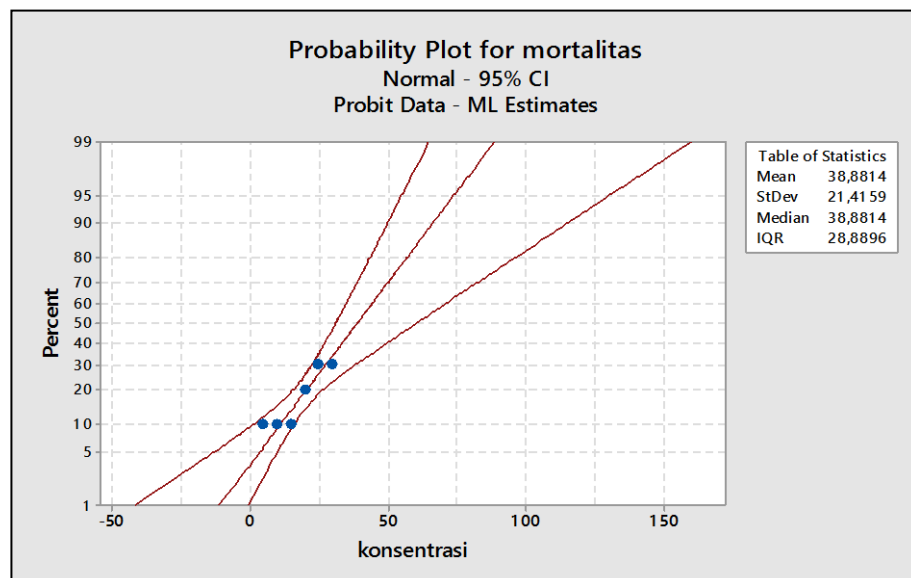
0 : kontrol pelarut tanpa sampel dan DMSO

0\* : kontrol DMSO tanpa sampel dan pelarut

Nilai  $LC_{50}$  diperoleh dari perhitungan menggunakan analisa probit dalam program MINITAB 17 dengan memasukkan data Mortalitas, jumlah larva dan konsentrasi. Kurva nilai  $LC_{50}$  isolat steroid menggunakan program MINITAB 17 ditunjukkan pada Gambar 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 dan 4.14.

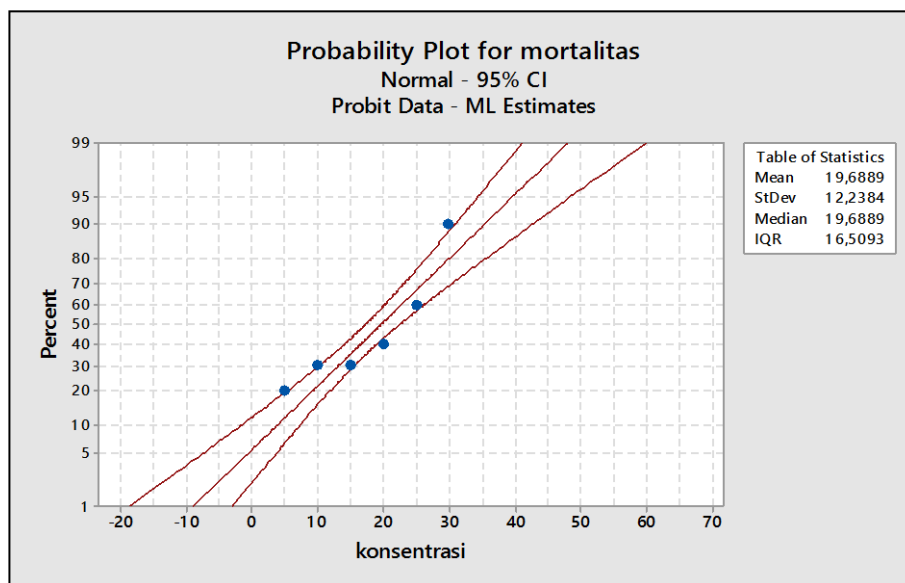


**Gambar 4.10 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada ekstrak metanol dengan nilai  $LC_{50}$ = 54,7793 ppm**



**Gambar 4.11 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada fraksi petroleum eter dengan nilai  $LC_{50}$ = 38,8814 ppm**

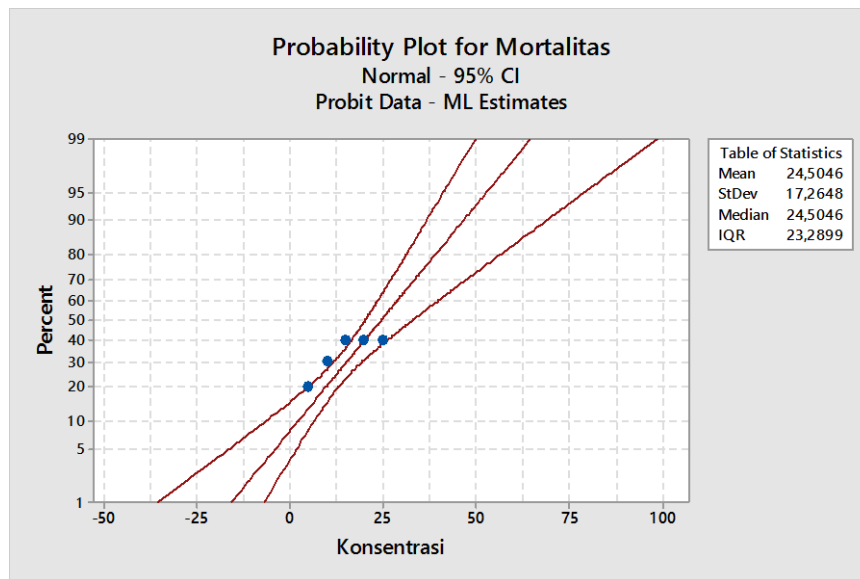




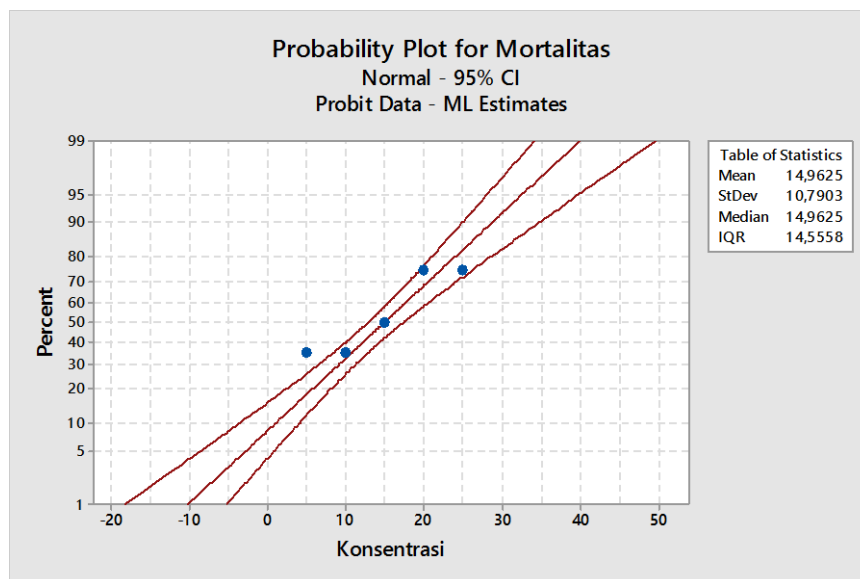
**Gambar 4.12 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada isolat senyawa steroid fraksi PE dengan nilai LC<sub>50</sub>= 19,6889 ppm**

Berdasarkan kurva mortalitas dari masing-masing sampel ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid, diperoleh nilai LC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 54,7793; 38,8814 dan 19,6889 ppm. Nilai LC<sub>50</sub> ini menunjukkan kecenderungan aktivitas yang meningkat. Hal ini kemungkinan disebabkan senyawa steroid yang terkandung dalam *Chlorella sp.* bekerja secara antagonis sehingga ketika senyawa steroid dalam kondisi lebih murni toksisitasnya cenderung meningkat dari pada ketika bergabung dengan senyawa lain dalam ekstrak. Hal ini kemungkinan juga disebabkan karena perbedaan jumlah kadar senyawa steroid antara senyawa steroid dalam 1 gram isolat dengan senyawa steroid dalam 1 gram ekstrak.

Senyawa steroid yang lebih murni tersebut dapat berpotensi sebagai antikanker. Penelitian Carballo, *et al.* (2002) menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara uji toksisitas (BSLT) dengan uji sitotoksik dalam pengujian aktivitas farmakologi produk bahan alam dari laut, dimana 50% spesies yang aktif dalam BSLT juga aktif dalam uji sitotoksik sebagai antikanker. Marraskuranto, dkk. (2008) melaporkan bahwa fraksi heksan *U. fasciata* bersifat sangat toksik terhadap *Artemia salina* L. dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 19,12 ppm dan bersifat toksik terhadap sel kanker HeLa (IC<sub>50</sub> = 25,6 ppm) dan sel kanker T47D (IC<sub>50</sub> = 28,7 ppm).



**Gambar 4.13 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada fraksi etil asetat dengan nilai  $LC_{50}$ = 24,5046 ppm**



**Gambar 4.14 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada isolat senyawa steroid fraksi etil asetat dengan nilai  $LC_{50}$ = 14,9625 ppm**

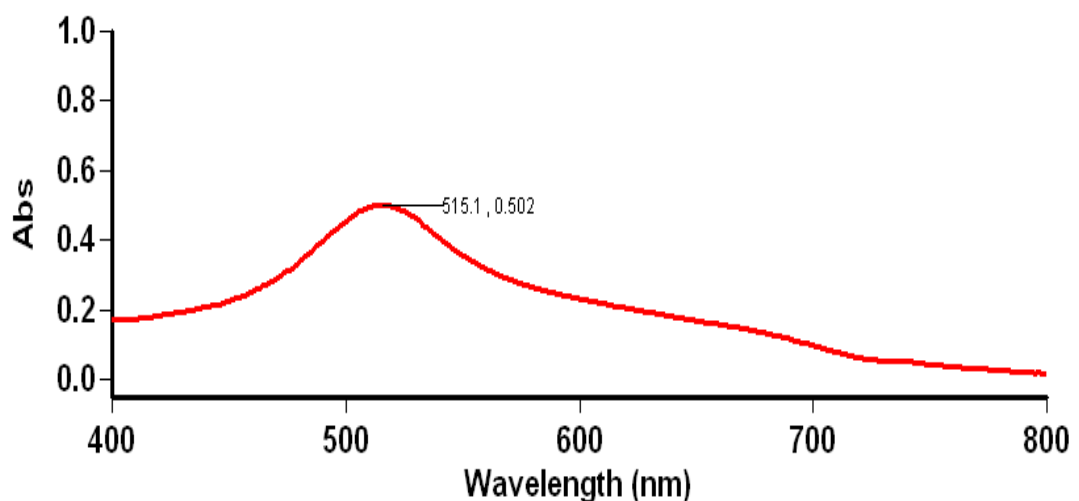
Berdasarkan Gambar 4.14 menunjukkan bahwa isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 14,9625 ppm. Hal tersebut menjelaskan bahwa isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap *Artemia Salina* L.

## 4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

### 4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap isolat hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) larutan DPPH 0,2 mM. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi tertinggi dimana hal ini menunjukkan bahwa radikal DPPH memiliki nilai absorbansi yang tertinggi. Panjang gelombang maksimum yang didapat akan digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*. DPPH memiliki warna komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm (Mardiyah, 2012) (Kuntorini, 2010).

Pengukuran panjang gelombang dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum dari radikal DPPH sebesar 515,0 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Mardiyah, (2012) bahwa radikal DPPH memiliki panjang gelombang maksimum 515 nm. Puncak panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar. 4.15.



**Gambar 4.15 Hasil Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM**

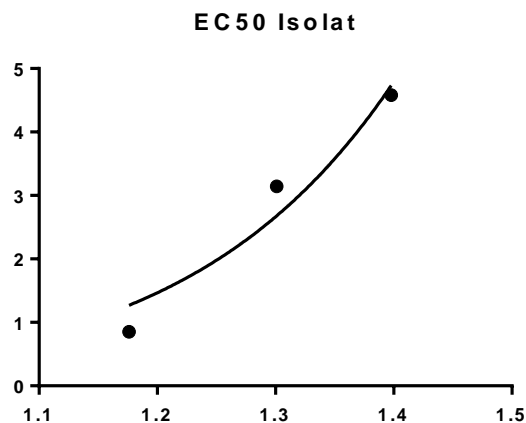
#### 4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan pada isolat senyawa steroid hasil KLTP. Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel menggunakan larutan kontrol 0,2 mM pada panjang gelombang 515 nm. Untuk menghindari terjadinya perubahan nilai yang signifikan maka dalam hal ini penggunaan larutan DPPH selalu dalam keadaan baru (*fresh*).

Absorbansi kontrol dan absorbansi sampel yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas (dalam bentuk %). Persen aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Rahayu *et al.*, 2010). Hasil pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan tidak memberikan perubahan warna kuning akan tetapi memberikan gradasi warna menjadi ungu muda (memudar).

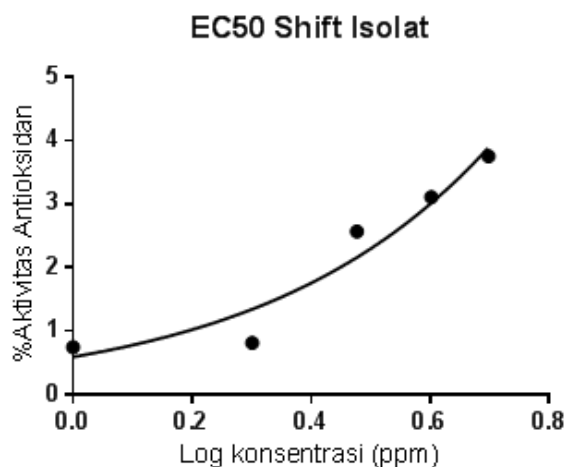
Parameter yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah persen aktivitas antioksidan dan nilai  $EC_{50}$ . Persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dianalisis menggunakan persamaan regresi non linier dengan *GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose response data*, sehingga didapatkan nilai  $EC_{50}$  dari masing-masing isolat.  $EC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004).

Data hasil uji aktivitas antioksidan disajikan pada Gambar 4.16 dan 4.17 serta Tabel 4.7. Data aktivitas antioksidan isolate KLTP dibandingkan dengan ekstrak metanol, fraksi hasil hidrolisis (etil asetat dan petroleum eter) dan vitamin C sebagai pembanding antioksidan alami serta BHT sebagai pembanding antioksidan sintetik.



**Gambar 4.16. Hasil pengukuran  $EC_{50}$  isolat KLTP fraksi etil asetat**

Isolat KLTP fraksi etil asetat memiliki nilai  $EC_{50}$  sebesar 77,78 ppm dimana nilai  $EC_{50}$  lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi etil asetat yaitu secara berturut-turut 1.334 ppm dan 332,7 ppm pada penelitian Anggraeni, (2014). Aktivitas antioksidan senyawa steroid memberikan nilai  $EC_{50}$  sebesar 77,78 ppm dimana menurut Wulandari, (2013), dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $EC_{50}$  kurang dari 50, dikatakan kuat jika nilai  $EC_{50}$  antara 50 – 100, dikatakan sedang jika nilai  $EC_{50}$  antara 100 – 150, dan dikatakan lemah jika nilai  $EC_{50}$  antara 151 – 200, hal ini menunjukkan bahwa isolat hasil KLTP fraksi etil asetat tergolong dalam antioksidan yang kuat.



**Gambar 4.17. Hasil pengukuran  $EC_{50}$  isolat KLTP fraksi petroleum eter**

Isolat KLTP fraksi petroleum eter memiliki nilai  $EC_{50}$  lebih kecil dibandingkan dengan fraksi PE (Tabel 4.7). Hasil ini menunjukkan bahwa isolat KLTP setelah dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter yang kemudian dipisahkan dengan KLTP memiliki potensi aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak sebelum dipisahkan dengan KLTP. Isolat KLTP termasuk dalam antioksidan yang kuat yaitu dengan penambahan antioksidan dari isolat sebanyak 73,82 ppm larutan uji akan menangkap radikal bebas sebanyak 50 % dari total radikal bebas.

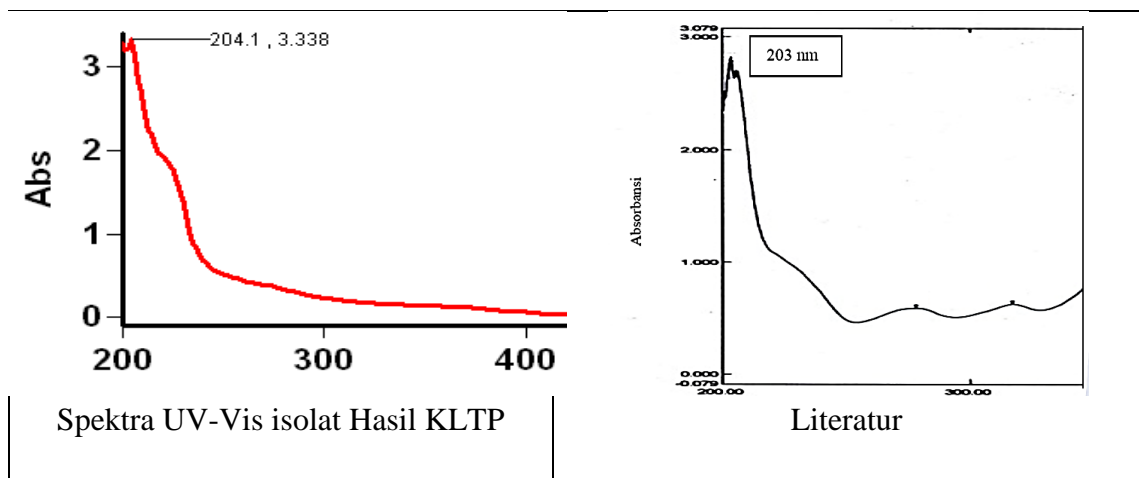
**Tabel 4.7 Nilai  $EC_{50}$  Fraksi PE, Isolat KLTP fraksi etil asetat dan PE serta Pembanding**

Sampel	Nilai $EC_{50}$ (ppm)
Ekstrak Metanol	1.334
Fraksi Etil Asetat	332,7
Fraksi PE	152,3
Isolat Etil asetat	77,78
Isolat PE	73,82

Isolat steroid memiliki nilai aktivitas antioksidan yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi. Hal ini diduga karena adanya efek antagonis antar senyawa yang terkandung di dalam ekstrak partisi etil asetat dan ekstrak metanol yang menyebabkan aktivitas antioksidannya memiliki nilai  $EC_{50}$  lebih besar dibandingkan dengan isolat steroid. Selain itu, faktor kemurnian senyawa aktif yang terkandung di dalamnya juga berpengaruh. Kadar senyawa aktif dalam isolate hasil KLTP lebih besar dari fraksi hasil hidrolisis dan partisi serta ekstrak metanol karena sudah melewati tahap pemurnian (pemisahan). Dalam satuan berat sampel yang sama jumlah senyawa aktif (steroid) yang terkandung di dalamnya berbeda. Jumlah steroid yang terkandung dalam isolate hasil KLTP lebih banyak daripada fraksi hasil hidrolisis dan partisi, apalagi ekstrak metanol. Aktivitas antioksidan sampel cenderung mengalami peningkatan mulai dari ekstrak metanol, fraksi hasil hidrolisis (lemah) dan partisi serta isolate hasil KLTP (kuat).

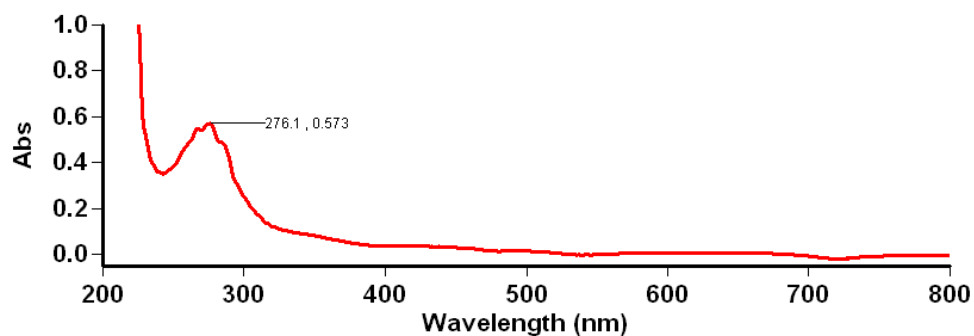
#### 4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* yaitu menggunakan instrumen UV-Vis yaitu dengan membandingkan panjang gelombang maksimum sampel dengan literature. Spektra UV-Vis dari isolat KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.18 dan 4.19.



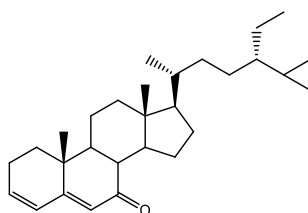
**Gambar 4.18 Spektra UV-Vis Isolat KLTP farksis etil astat *Chlorella sp.***

Berdasarkan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum dari isolat steroid adalah 204 nm hal ini diperkirakan mendekati dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Aprelia, (2013) dimana diperoleh panjang gelombang senyawa steroid dari tumbuhan paku pada panjang gelombang maksimum 203 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi.



**Gambar 4.19 Hasil spektra UV-Vis isolat KLTP fraksi PE *Chlorella sp.***

Hasil analisis pola serapan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari isolat KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan panjang gelombang maksimum 276 nm dengan absorbansi maksimum sebesar 0,573. Panjang gelombang maksimum tersebut menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sesuai dengan milik Susilawati (2010) bahwa spot warna hijau kebiruan hasil isolasi dengan KLT memberikan serapan panjang gelombang 271 nm dengan dugaan senyawa steroid. Selain itu, isolasi senyawa steroid juga teridentifikasi pada alga merah *Gracilaria edulis* oleh Dast dan Srinivas (1992) yang menunjukkan panjang gelombang maksimum 278 nm pada senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on. Hal ini menunjukkan bahwa pada serapan 276 nm memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang sesuai dengan kaidah Woodward-Fieser dalam meramalkan serapan maksimum untuk sistem diena menggunakan harga dasar 214 nm dan didapat panjang gelombang berdasarkan perhitungan Woodward-Fieser sebesar 279 nm. Berdasarkan hasil tersebut maka isolat hasil KLTP pada penelitian ini diduga merupakan senyawa steroid dengan dugaan struktur seperti Gambar 4.20. Hasil panjang gelombang tersebut didukung dengan analisis FTIR mikroalga *Chlorella sp.* oleh Handoko (2016) yang menunjukkan adanya ikatan C=C dengan pita serapan  $1647,70\text{ cm}^{-1}$  dan rentangan C=O pada daerah serapan  $1738\text{ cm}^{-1}$ . Selain itu, pita serapan  $2927,49\text{ cm}^{-1}$  dan  $2856,61\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan kemungkinan adanya gugus metil ( $\text{CH}_3$ ) dan metilen ( $\text{CH}_2$ ). Dugaan ini diperkuat dengan adanya vibrasi C-H tekuk pada pita serapan  $1463,42\text{ cm}^{-1}$  dan  $1383,73\text{ cm}^{-1}$ . Adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa steroid.



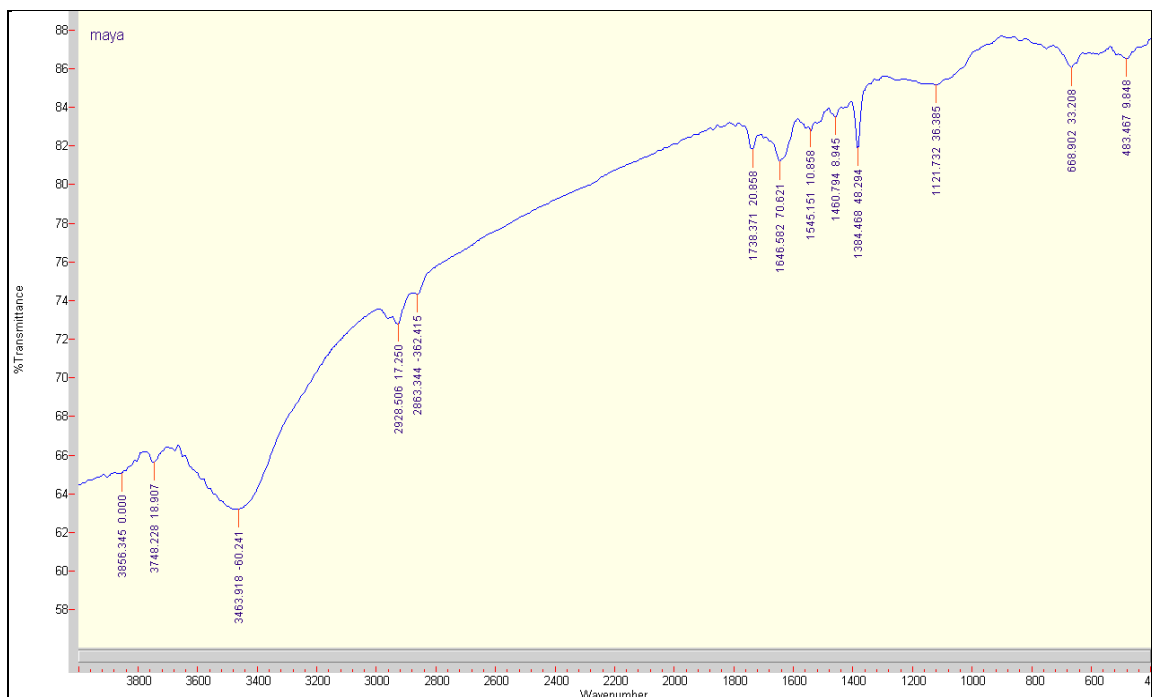
**Gambar 4.20 Senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on  
(Dast dan Srinivas, 1992)**



#### 4.9 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Spektrofotometer FTIR

Spektrofotometer infra merah mengidentifikasi gugus fungsional suatu senyawa berdasarkan perbedaan momen dipol yang dapat bervibrasi sehingga dapat terbaca oleh sinar infra merah yang ditunjukkan serapan yang spesifik. Isolat hasil KLTP yang digunakan untuk identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah adalah isolat yang dimungkinkan termasuk ke dalam senyawa steroid. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya Imamah, dkk., (2015) yang menunjukkan adanya warna hijau pada hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*. Analisis hasil KLTP tersebut kemudian didukung dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah.

Hasil spektra spektrofotometer infra merah dari isolasi senyawa hasil KLTP fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.21.



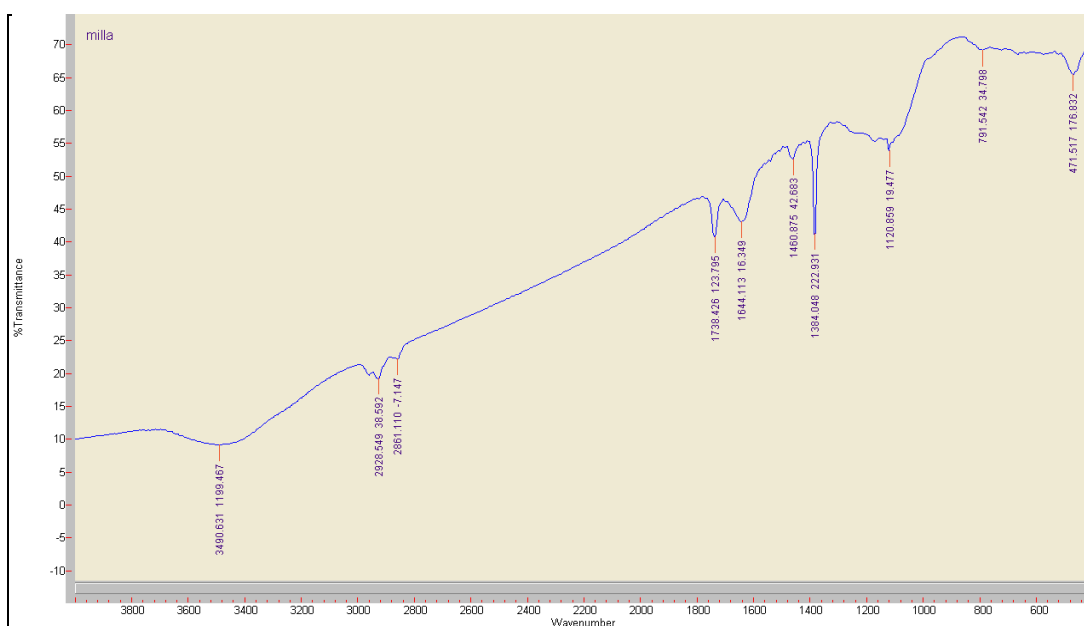
**Gambar 4.21 Spektra Infra Merah isolat hasil pemisahan dengan KLT Preparatif mikroalga *Chlorella sp.***

Berdasarkan spektra infra merah isolat dari hasil pemisahan KLTP pada Gambar 4.21 dapat dilihat bahwa puncak serapan lebar terbentuk pada bilangan gelombang  $3463,91\text{ cm}^{-1}$ , pada panjang gelombang tersebut terdapat serapan uluran simetri gugus O-H. Pita serapan  $2928,50\text{ cm}^{-1}$  dan  $2863,34\text{ cm}^{-1}$  diduga mengandung rentangan -CH alifatik. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya gugus metil ( $\text{CH}_3$ ) dan metilen ( $\text{CH}_2$ ) (Socrates, 1994). Dugaan ini diperkuat dengan vibrasi C-H tekuk yang mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil yang umumnya ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2004). Vibrasi C-H tekuk terdapat pada pita serapan  $1460,79\text{ cm}^{-1}$  dan  $1384,46\text{ cm}^{-1}$ . Serapan pada bilangan gelombang  $668,90\text{ cm}^{-1}$  merupakan serapan dari C-H gugus alkena dengan intensitas lemah. Pada bilangan gelombang  $1738,37\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan rangkap C=O dan C=C dengan daerah serapan  $1646,58\text{ cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang  $1121,73\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi C-OH sekunder. Pita serapan  $668,90\text{ cm}^{-1}$  merupakan daerah pendukung dengan serapan =C-H (alkena).

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer infra merah ini didukung dengan penelitian Imamah, dkk., (2015) yang menyebutkan bahwa isolat mikroalga *Chlorella sp.* memiliki serapan pada bilangan gelombang antara  $3450,61\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2926,28\text{ cm}^{-1}$  dan  $2857,60\text{ cm}^{-1}$  (-CH alifatik),  $1737,22\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1638,98\text{ cm}^{-1}$  (C=C),  $1465,93\text{ cm}^{-1}$  dan  $1387,09\text{ cm}^{-1}$  (C-H tekuk),  $1254,92\text{ cm}^{-1}$  (C-O),  $1164,47\text{ cm}^{-1}$  dan  $1064,03\text{ cm}^{-1}$  (C-O primer). Berdasarkan hasil tersebut maka isolat diduga merupakan steroid yang memiliki C=C, C=O, C=OH tersier, OH dan gem dimetil. Menurut Sukadana (2011) dan Saleh (2010) senyawa steroid memiliki gugus fungsi karakteristik seperti O-H, C-H, C=C dan C=O.

Adapun spektrum inframerah isolat senyawa steroid hasil KLT preparative ditunjukkan pada Gambar 4.22 dan Tabel 4.8. Spektrum inframerah memperlihatkan bahwa senyawa toksik yang diperoleh menunjukkan serapan melebar pada  $3490,631\text{ cm}^{-1}$  yang diduga adalah serapan ulur (stretching) dari gugus Hidroksil O-H ( $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ ). Serapan pada  $2928,549\text{ cm}^{-1}$  merupakan serapan ulur (stretching) C-H alifatik yaitu dari  $\text{sp}^3$  atau C-H dari metilen ( $\text{CH}_2$ ), dugaan ini diperkuat dengan adanya serapan bilangan gelombang pada  $1460,875$

$\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya tekukan C-H dari  $\text{CH}_2$  yang memiliki kisaran bilangan gelombang antara  $1440\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$  (Socrates, 1994), dan serapan  $2861,110\text{ cm}^{-1}$  diduga adanya gugus metil ( $\text{CH}_3$ ) yang diperkuat dengan adanya serapan pada  $1384,048\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya  $\text{CH}_3$  alifatik (Sudjaji, 1988). Adanya vibrasi C-H tekuk pada spectra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2014).



**Gambar 4.22 Spektra FTIR isolat senyawa steroid hasil KLTP fraksi PE**

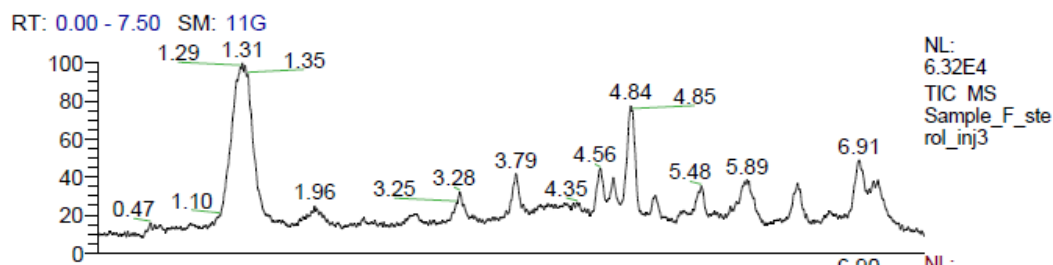
**Tabel 4.8 Interpretasi spektrum inframerah dari isolate KLTP fraksi PE**

Bilangan gelombang ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ )	Bentuk pita	Intensitas	Penempatan gugus terkait
3490,631	Melebar	Sedang	O-H (ikatan hidrogen antarmolekul) <i>stretching</i>
2928,549	Tajam	Lemah	$\text{Csp}^3\text{-H stretching (-CH}_2\text{)}$
2861,110	Tajam	Lemah	$\text{Csp}^3\text{-H stretching (-CH}_3\text{)}$
1738,426	Tajam	Sedang	$\text{C=O stretching}$
1644,113	Tajam	Sedang	$\text{C=C stretching non konjugasi}$
1460,875	Tajam	Lemah	C-H pada $(\text{CH}_2)$ <i>bending</i>
1384,048	Tajam	Kuat	C-H pada $\text{CH}_3$ <i>bending</i>
1120,859	Tajam	Lemah	C-OH (alkohol sekunder)
791,542	Tajam	Lemah	$\text{=C-H bending (out of plane)}$

Pita serapan 1644,113  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya uluran (stretching) C=C alkena non konjugasi (1620-1680  $\text{cm}^{-1}$ ) dan diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 791,542  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya tekukan =C-H (650-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) (Saleh, 2009) dan adanya rentangan C=O pada serapan 1738,426  $\text{cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang 1120,859  $\text{cm}^{-1}$  diduga terdapat serapan dari gugus C-OH sekunder. Berdasarkan hasil ini maka isolat toksik hasil partisi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* diduga merupakan senyawa steroid yang memiliki gugus C=C, C-OH sekunder, hidroksil O-H dan gem dimetil.

#### 4.10 Identifikasi dengan LC-MS

Identifikasi dengan LCMS dilakukan terhadap fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* tujuan dari identifikasi ini adalah untuk mengetahui kandungan steroid apa saja yang terkandung di dalamnya. Kromatogram dan hasil analisa LCMS fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* disajikan pada Gambar 4.23 dan Tabel 4.9.



Gambar 4.23. Total ionic chromatogram (TIC) LCMS fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.*

Tabel 4.9. Kandungan Steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* berdasar hasil LCMS

No.	EIC (ESI)	Senyawa
1.	395 dan 413	Fucosterol
2.	369 dan 409	Kolesterol
3.	415	B-Sitosterol
4.	465	Erytodiol atau Uvaol

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L. dengan nilai  $LC_{50}$  14,9625 dan 19,6889 ppm. Isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai antikanker atau antitumor karena memiliki nilai  $LC_{50}$  di bawah 30 ppm.
2. Isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dengan nilai  $EC_{50}$  77,78 dan 73,82 ppm. Aktivitas antioksidan isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* tergolong kuat karena memiliki nilai  $EC_{50}$  di bawah 100 ppm.
3. Hasil identifikasi dengan uji fitokimia, spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS menunjukkan bahwa isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter dan *Chlorella sp.* positif mengandung senyawa steroid.

#### **5.2 Saran**

1. Diperlukan pemurnian senyawa steroid yang lebih spesifik dengan instrumen seperti kromatografi kolom.
2. Diperlukan identifikasi dengan HNMR agar strukturnya dapat diketahui.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M. 2009. *Superfoods for Optimum Health: Chlorella and Spirulina*. London: Truth Publishing. Inc.
- Amaliyah, S., A. Ghanaim F. dan A. Hanapi. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella Sp.* Hasil Kultivasi Dalam Media Ekstrak Tauge (Met). *Skripsi*. UIN Malang
- Anggraeni, O. N., A. Ghanaim F., Munirul, A. dan A. Hanapi. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Astuti, P., S. Utami, T. Pratiwi, T. Hertiani, G. Alam, A. Tahir dan S. Wahyono. 2005. *Antimicrobial Activity Screening of Marine Sponge Extracts Colected from Barang Lomposea. Journal of Traditional Medicine* (10): 32.
- Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2004. Isolasi Steroid dari Fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3
- Aprilia, Fitria dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Journal of Chemistry* Vol. 2 No. 3. Surabaya: UNESA
- Bariyyah, S. K., A. Ghanaim F., Munirul, A., dan A. Hanapi. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Benedetti, S., F. Benvenuti, S. Paglianari, S. Francogli, S. Scoglio and F. Canestrari. 2004. *Antioxidant Properties of a Novel Phycocyanin Extract from the Blue-Green Alga Aphanizomenon flosaquae. Life Sciences*, LXXV: 2353-2362.
- Bold, C. H. dan Wynne, J. M. 1985. *Introduction to The Algae Structure And Reproduction Pentice-Hall*. New York: Inc. Englewood Cliff.

- Borowitzka, M. 1995. Microalgae as Source of Pharmaceutical and Other Biologically Active Compounds. *Journal of Applied Phycology*. Volume 7: 3-15.
- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.S., 2002. A comparasion between two brine Shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity marine nature products. *BMC Biotechnology* 2; 17 (5p)
- Daniel. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). *Mulawarman Scientific*, 9:1.
- Dast, B. dan Srinivas, K. 1991. Minor C<sub>29</sub> Steroid From The Marine Gracilaria Edulis. *Journal*. Vol. 31. No. 7.
- De Godos, I., Hector, O., Guzman, S., Pedro, A., García, E., Eloy, B., Raul, M. dan Virginia, A. 2010. Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggyery wastewater treatment. *J Bioresource Tech.*, 10: 153-158
- Desianti, N., A. Ghanaim F., dan Tri Kustono A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Diastuti, H. dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 21, No. 4: 266-271
- Diaz, B. C., *et al.* 2007. Separation and Determination of Sterols in Olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 102: 593-598
- Fasya, A. G., Umi, K., Suci, A., Siti Khairul, B. dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) pada Fase Pertumbuhan. *ALCHEMY*. Vol. 2, No. 3: 162-169
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid I. Terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina*

- Leach. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA*. Vol.9 No.1
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Hartika, R. 2009. Aktivitas Inhibisi  $\alpha$ -Glukosidase Ekstrak Senyawa Golongan Flavonoid Buah Mahkota Dewa. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Hayati, E. K. 2007. *Dasar-Dasar Analisis Spektroskopi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, hal 35-41.
- Hayati, E.K. dan Nur Halimah. 2010. Phitochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) Plant Extract. *ALCHEMY*. Vol. 1, No. 2: 53-103
- Hendrawati, A. R. E. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). *Laporan Akhir Karya Tulis Ilmiah*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
- Hidayah, H., A. Ghanaim F. dan A. hanapi. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Imamah, N., A. Ghanaim F. dan Tri Kustono A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Karger; Synder dan Hovart. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John dan Sons.



- Khamidah, U., A. Ghanaim F. dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Konishi, F., Tanaka, K. dan Himeno, K. 1985. Antitumor Effect Induced by a Hot Water Extract of *Chlorella vulgaris* (CE): Resistance to Meth-A Tumor Growth Mediated by CE-Induced Polymorphonuclear Leukocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 19: 73-78
- Kuntorini, E.M. dan M.D. Astuti. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawabg Dayak (*Eleutherine americana* Merr). *Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 4., No. 1: 15-22.
- Kusmiati, Agustini, N. W. S., Tamat, S. R. dan Irawati, M. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia*, 5 (1): 30 - 34
- Lenny, S dan Zuhra, C. F. 2005. *Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (Graptophyllum pictum L. Griff) dengan Metode Brine Shrimp*. *Jurnal Komunikasi Penelitian*, 17 (5): 56 - 59.
- Lewaru, M. W. 2007. Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh pada Media Kultur PHM terhadap Kandungan Protein *Chlorella sp.* *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6(1): 37 – 42.
- Lisdawati, V. 2002. [Berdasar Uji Penapsisan Farmakologi pada Buah Mahkota Dewa](http://www.farmakologi.fk.ugm.ac.id/2008/05/30/berdasar-uji-penapsisan-farmakologi-pada-buah-mahkota-dewa/). Fakultas Kedokteran. Yogyakarta: Universitas Gajamada. <http://www.farmakologi.fk.ugm.ac.id/2008/05/30/berdasar-uji-penapsisan-farmakologi-pada-buah-mahkota-dewa/> (diunduh tanggal 15 Juni 2012).
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Marliana, E. 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang Berfungsi sebagai Antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA*. Vol. 1, No. 1: 23-29
- Meyer, P. S. dan Ausubel. J. H. 1999. Carrying Capacity: A Model with Logically Varying Limits. *J. Technological Forecasting and Sosial Change*, 61 (3), pp: 209–214.

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. Vol. 45: 31-34
- Miranda, M.S., R.G. Cintra, S.B.M. Barros and J. Mancini-Filho. 1998. *Antioxidant Activity of the Microalga Spirulina maxima*. *Brazilian Medical and Biological Research*, XXXI: 1075-1079.
- Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (Dpph) For Estimating Antioxidant Activity*. *Songklanarin J. Sci. Technol*, 26 (2), 211-219.
- Noda, K., Ohno, N. dan Tanaka, K. 1996. A Water-Soluble Antitumor Glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Med*, 62: 423-426.
- Oktavia, D.R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat, dan Etanol Daun Binahong (*Anredera corfolia* (Tenore) Steen.) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Oliveira, Naiara M., Carla L. C. M., Rosane, M. A., Djalma M. D. O., Carlos, W. N. M., Sidney, A. V. F. 2015. *Biological Activities Of Extracts From Padina Boergesenii And Sargassum Stenophyllum, Seaweeds Naturally Found In Baia De Todos Os Santos, Brazil*. *Journal International of Pharmamaceutical Science*. Vol 7 Issue 1 2015.
- Pelczar dan Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Alih Bahasa: Hadjoetomo, R.S. Jakarta: UI Press.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prihantini, N. B., Putri, B. dan Yuniati, R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains*, Vol. 9(1) : 1 - 6.
- Puspita, M.D.A. 2009 pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB.
- Putra, D.A.D.. 2012. Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Bunga Tahi Ayam (*Tagetes Erecta* L.) serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Universitas Sumatera Utara.
- Rahayu, M.R., James, S. dan I Made, D.S. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol Spons *Callyspongia aerizusa* terhadap Larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia*. Vol.1, No.1 : 1-7

- Rakhmawati, F. dan Sutimin. 2006. Model Pemanenan Logistik dengan Daya Dukung Bergantung Waktu pada Budidaya Rumput Laut. *Prosiding SPMIPA*: pp: 43 – 49.
- Reveny, J. 2011. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn). *Jurnal Ilmu Dasar*. Volume 12. Nomor 1.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A. dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Rohman, A., Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). *Agritech*, XXV (3): 131-136.
- Rostini, I. 2007. *Kultur Fitoplankton (Chlorella sp. dan Tetraselmis chuii) pada Skala Laboratorium*. Jatinangor: Universitas Padjajaran.
- Saleh, C. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Kulit Batang Maja (*Aeglemarmelos* (L.) Correa). *Jurnal Kimia*. Volume 7 Nomor 1
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty
- Setyaningsih, I.; Linawati; Trianti, R. dan Ibrahim, B. 1999. Ekstraksi dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga Chlorella sp. *Bulletin THP*. Volume VI, Nomor 1.
- Sidabutar, E.A.. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Institut Pertanian Bogor.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic group Frequencies -2<sup>nd</sup> Edition*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sriwardani, T. 2000. *Pemisahan Ekstrak Intraseluler dari Mikroalga Chlorella sp. dan Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Terhadap Bakteri dan Kapang Patogen* [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Steenblock, D. 1996. *Chlorella Makanan Sehat Alami*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.

- Sukadana, I. M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid Pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L.). *Jurnal Kimia*. Vol. 8, No. 2: 169-174
- Supriadi. 2012. *Mikroalga, Sumber Energi Masa Depan*. [http://www.seafoodservicecentre.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=147:-mikroalga-sumber-energi-masa-depan&catid=34](http://www.seafoodservicecentre.com/index.php?option=com_content&view=article&id=147:-mikroalga-sumber-energi-masa-depan&catid=34)
- Susilawati, H. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum Torvum*). *Jurnal Repository university of Riau*.
- Susilawati, Hafni I. N. S. T., dan Widya, L. 2015. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Steroid Dari Daun Rimbang (*Solanum Torvum*). *Jurnal Repository university of Riau*.
- Tensiska, Marsetio, Silviah, Oktaviah, N.Y. 2007. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon Dari Ampas Tahu*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Uma, R.; Sivasubramanian, V. dan Devaraj, S. N. 2011. Preliminary Phycochemical Analysis and In Vitro Antibacterial Screening of Green Microalgae, *Desmococcus olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utilization*. Volume 2(3): 74-81.
- Wahyuni, S. 2006. Aktivitas Kitooglimer Hasil Reaksi Enzimatis Terhadap Polimerisasi Sel Limfosit dan Sel Kanker. *Disertasi* Tidak Diterbitkan. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wibowo, A. dan Haryoto. 2004. Kinetika Bioakumulasi Logam Berat Kadmium oleh Fitoplankton *Chlorella sp.* Lingkungan Perairan Laut. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 5 (2) : 89 - 103.
- Wulandari, A. P.; Naderia, F.; Pattalia, A. E. dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Jatinangor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran. 535-542.
- Wulandari, M., Nora I., dan Gusrizal. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (*Citrus microcarpe Bunge*). *Jurnal JKK* tahun 2013, volume 2 (2), 90 – 94.
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A. & Esparza, M. 2003. HPLC-Fluorescence Detection and Adsorption of Bisphenol A, 17 $\beta$ -Estradiol, and 17 $\alpha$ -

Ethynyl Estradiol on Powdered Activated Carbon. *Water Research* No. 37: 3530-3537

Yudha, A. P. 2008. *Senyawa Antibakteri dari Mikroalga Dunaliella sp. pada Umur Panen yang Berbeda* [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

**JADWAL KEGIATAN**  
**SEMINAR PENELITIAN KOMPETITIF INDIVIDUAL**  
**PROGRAM BANTUAN DANA PENELITIAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

<b>Kegiatan</b>	<b>Jam</b>	<b>Acara</b>	<b>Narasumber</b>
<b>Seminar proposal</b> Hari : Rabu, Tanggal: 2 Maret 2016 Pukul : 08.00 WIB Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek	08.00-08.30	Pembukaan	A. Ghanaim Fasya, M.Si.
	08.30-10.30	Presentasi Proposal Penelitian	
	10.30-11.30	Diskusi dan Tanya jawab	
<b>Seminar Hasil</b> Hari : Kamis, Tanggal: 8 September 2016 Pukul : 12.30 WIB Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek	12.30-13.00	Pembukaan	A. Ghanaim Fasya, M.Si.
	13.00-15.00	Presentasi Hasil Penelitian	
	15.00-16.00	Diskusi dan Tanya jawab	

## **LAMPIRAN. DAFTAR RIWAYAT HIDUP**

### **Ketua Peneliti**

1. Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
NIP : 10820616 200604 1 002  
Pangkat/Gol. : Penata/III-c
2. Tempat dan Tanggal Lahir : Nganjuk, 16 Juni 1982  
Jenis Kelamin : Laki-laki
3. Program Studi : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Perguruan Tinggi : Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Malang  
No. Telpn / Fax Kantor : (0341) 558933 / (0341) 558933
4. Alamat :  
Rumah : Perum Gajayana Inside B.11 Merjosari Malang  
Email : fasya.organik.uinmalang@gmail.com  
No. Handphone : 081331087496
5. Riwayat Pendidikan  
Pendidikan Formal :
  - **1988-1994** SDN Gondang I
  - **1994-1997** SMPN 1 Pace
  - **1997-2000** SMUN 2 Nganjuk
  - **2000-2004** Sarjana Kimia (S1) Universitas Brawijaya Malang
  - **2008-2011** S2 Kimia Universitas Brawijaya MalangPendidikan NonFormal :
  - **1988-1995** Madrasah Ibtidaiyah Bahrul Ulum Cerme Pace Nganjuk
  - **1995-1998** Madrasah Tsanawiyah Bahrul Ulum Cerme Pace Nganjuk
  - **2001-2004** Madrasah Ulya Matholiul Huda Gading Malang
  - **2000-2005** Pondok Pesantren Miftahul Huda Gading Malang
  - **2006-2010** Pesantren Mahasiswa Darul Hijrah Merjosari Malang
  - **2011- 2012** Pondok Pesantren Anwarul Huda Karang Besuki Malang
6. Bidang Keahlian : Kimia Organik

## 7. Pengalaman Penelitian:

- **2004 Fasya, A.G.,** Roosdiana, A. dan Sutrisno, Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Dehalogenase 4-klorofenol dari *Pseudomonas putida*. Malang. Juni
- **2009** Hayati, E.K., Jannah, A. dan **Fasya, A.G.,** , Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa billimbi* l.) Sebagai Pengawet Alami, Malang, Desember
- **2009** E. Yulianti, **Fasya, A.G.,** F. Wiyaningsih dan S. Aisyah, Pengolahan Minyak Goreng Bekas, Malang, Desember
- **2010** E. Yulianti, **Fasya, A.G.,** R. Heli dan L. N. Syam, Pengaruh Penambahan Karbon Aktif Biji Kelor (*Moringa oliefera* Lamk) teraktivasi nacl pada pengolahan (*Bleaching*) Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Kaya Omega-3, Malang, November
- **2010** A. Jannah, E.K. Hayati dan **Fasya, A.G.,** Pengawetan Ikan Dengan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa billimbi* L.) : Pencarian Formula Efektif Dan Analisa Secara Kualitatif Dan Kuantitatif, Malang, Desember
- **2011 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, M.F. Rahman, S. Duengo, dan Warsito, Sintesis Metil 10,12,14-oktadekatrienoat dari Asam 9,12,15-oktadekatrienoat (Asam  $\alpha$ -linolenat) Biji Selasih (*Ocimum basilicum*) dan Uji Bioaktivitasnya, Malang, April
- **2011** E. Yulianti, dan **Fasya, A.G.,** Komposisi Asam Lemak Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Hasil Bleaching Karbon Aktif Biji Kelor (*Moringa oleivera*, Lam) Menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM)", Desember
- **2011** E. Yulianti, dan **Fasya, A.G.,** Pengaruh Proses Pengolahan (*Degumming*, *Refining*, dan *Bleaching*) dengan Karbon Aktif Polong Buah Kelor Teraktivasi NaCl terhadap Asam-asam Lemak Jenuh dan Tak Jenuh Minyak Ikan Hasil Samping Pengalengan Ikan, Desember
- **2011** Dewi, D.C., **Fasya, A.G.,** Hanapi, A., Kurniawan, Y.E., dan Juairiyah, Uji kelarutan Batu Ginjal Kalsium dalam Campuran Ekstrak Akuades Daun Lateng ( *Urtica gradidentata* M. Non Moris) dan Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn) secara in Vitro, Desember
- **2012 Fasya, A.G.,** Hanapi, A., Mardiyah, U. dan Miftahurrahmah, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Hasil Partisi dengan Etil Asetat dan n-heksana Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi, Desember
- **2012** Jannah, A. dan **Fasya, A.G.,** Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul, Desember
- **2013. Fasya, A.G.,** Uji Bioktivitas Ekstrak Metanol dan Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. Oktober.
- **2013. Fasya, A.G.,** Uji Aktivitas antioksidan dan Antibakteri Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. Desember.



- **2014. Fasya, A.G.,** Hanapi, A., Ningseh, R.A.Sintesis Senyawa 4-hidroksi-3-metoks-5-(fenildiaznil) benzaldehida dan Uji Antioksidannya terhadap DPPH. Oktober
- **2015. Fasya, A.G.,** Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dari Mikroalga *Eucheuma spinosum*.
- **2015. Fasya, A.G.,** Isolasi dan Pemisahan Senyawa Obat (Steroid) dari Mikroalga *Eucheuma spinosum*

#### 8. Publikasi Ilmiah

- **2007 Fasya, A.G.** Kimia Organik I: Struktur Senyawa Organik, KJM UIN Malang, Januari.
- **2007 Fasya, A.G.,** Roosdiana, A. dan Sutrisno, Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Dehalogenase 4-klorofenol dari *Pseudomonas putida*. Seminar Basic Science IV, Universitas Brawijaya, Malang. Februari.
- **2007 Fasya, A.G.** Enzim Dehalogenase Sebagai Pengurai Limbah Pestisida 4-korofenol, Jurnal Saintika, Vol.4 No. 2 (ISSN 1693-640X), UIN Malang. Mei-Agustus.
- **2011 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, and M.F. Rahman, Isomerization and Toxicity Test of Methyl Linolenic Ester of  $\alpha$ -Linolenic Acid Isolated From *Ocimum Basilicum* Seeds, Internasional Conference On Basic Science 2011, Brawijaya University, Malang, Februari
- **2011 Warsito, Jumina, Chairil Anwar, Rurini Retnowati, A. Ghanaim Fasya** and Suleman Duengo, Enrichment of  $\alpha$ -(Alpha) Linolenic Acid of Basil Seed Oil, *Ocimum Basilicum* L. By Fractional Crystallization in Urea Inclusion Complexes, Indonesian Journal of Chemistry, Vol.11, No.1, March
- **2011 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, and M.F. Rahman, Pemurnian (Purifikasi) Metil-9Z,12Z,15Z-Oktadekatrienoat Hasil Esterifikasi Dari Asam  $\alpha$ -Linolenat Biji Selasih (*Ocimum basilicum*), Seminar Nasional Green Technology 2, UIN Malang, November
- **2012 Fasya, A.G.** dan Jannah, A., Effectiveness Citric Acid In Milkfish Bone (*Chanos-Chanos Forskal*) Gelatin Production, International Conference on Halal Science & Technology, Denpasar Bali, Juli
- **2012 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, and M.F. Rahman, Antioxidant Activity of Methyl 9Z,12Z,15Z-Octadecatrienoate (Methyl Ester Of  $\alpha$ -Linolenic Acid Isolated from *Ocimum basilicum* Seeds) and Its Isomer, International Conference of The Indonesian Chemical Society, Brawijaya University Malang, September
- **2012 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, M.F. Rahman, Duengo, S. Dan Warsito, Isolasi Asam -9Z,12Z,15Z-oktadekatrienoat dari Biji Selasih (*Ocimum basilicum*), ALCHEMY, Journal of Chemistry, vol.2 No. 1, Oktober
- **2012 Fasya, A.G.,** R. Retnowati, M.F. Rahman, Duengo, S. Dan Warsito, Sintesis metil 10,12,14-oktadekatrienoat dari asam 9,12,15-oktadekatrienoat (asam  $\alpha$ -linolenat) Biji selasih (*ocimum basilicum*) dan uji bioaktivitasnya, Seminar Nasional Green Technology 3, UIN Malang, November
- **2013 Fasya, A.G.,** Amaliyah, S., Bariyyah, S.K., Khamidah, U., Romaidi, Hanapi Toxicity, Antioxidant and Antibacterial Activity Test of Methanol

Extract of *Chlorella sp.* Microalgae Result Cultivation in Tauge Extract Medium, Seminar Nasional Green Technology 4, UIN Malang, November

- **2013 Fasya, A.G.,** Amaliyah, S., Bariyyah, S.K., Khamidah, U., Romaidi, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga (*Chlorella sp.*) Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge pada Tiap Fase Pertumbuhan, *ALCHEMY, Journal of Chemistry*, vol.2 No. 1, Oktober
- **2014 Fasya, A.G., dkk.** Uji Aktivitas Antibakteri Hasil ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorlla sp.* Hasil kultivasi dalam Mdium ekstrak Tauge (MET) pada tiap fase Pertumbuhan. *ALCHEMY, Journal of Chemistry*, vol.3 No. 1, Oktober
- **2014 Fasya, A.G.,** Kumalasari, D., Susanti, V., Zahra', A.K., Adi, T.K., Hanapi. A., Maunatin, A. Identification of *chlorella sp.* Microalgae fatty acid by gas chromatography- mass spectrophotometer. International Seminar on Green Technology 5, UIN Malang, November
- **2015. Fasya,dkk.** Isolasi Steroid dari Fraksi Etil Asetat dn Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. SIMNAS KBA XXIII, UM Malang, November.

#### 9 . Pengabdian Masyarakat

- **2006 – 2010** Pengajar di Pesantren Mahasiswa Darul Hijrah Merjosari. Malang.
- **2008.** Penyuluhan Pembuatan Kompos di Desa Gadingkulon Dau. Malang. Juli
- **2008** Pemateri Kegiatan Parent's Day "Permainan Kimia" SD Islam Surya Buana. September
- **2008** Pengadaan Air Bersih di Daerah Bencana di Desa Pait Kec. Kasembon Kab. Malang. Desember
- **2009** Pembangunan Biogas di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang. November
- **2011** Pengabdian Masyarakat Tematik Posdaya Berbasis Masjid Pembinaan Keagamaan Dan Kesehatan Lingkungan Masjid Ar-Rahman Desa Banjardowo Kecamatan Kabuh Kabupaten Jombang, Oktober
- **2012** Pengabdian Masyarakat Sosialisasi Pengolahan Pasca Panen Daun Belimbing Wuluh Sebagai Tepung Ikan Di Kelurahan Gadang Kecamatan Sukun Kota Malang, Februari
- **2012** Pengurus di PP Anwarul Huda, Karang Besuki Malang
- **2012 – sekarang** Pengajar di PP Anwarul Huda, Karang Besuki Malang
- **2012** Pengabdian Masyarakat Tematik Posdaya Berbasis Masjid Pembinaan Kependidikan, Keagamaan dan Kewirausahaan Lingkungan Masjid Baitul Amin Dukuh Jaten Kelurahan Bendogerit Kecamatan Sananwetan Kota Blitar, Desember
- **2013** Pengabdian Masyarakat Sosialisasi Alternatif Bahan Tambahan (Zat Aditif) Yang *Halalan* dan *Toyyiban* Di Kelurahan Gadang Kecamatan Sukun Kota Malang, Februari

- **2013** Penyuluhan dan Pelatihan Deteksi Pewarna Berbahaya pada Makanan Di Kelurahan Tasikmadu Kecamatan Lowok Waru Kota Malang, Oktober
- **2013** Pengabdian Masyarakat Tematik Posdaya Berbasis Masjid Pembinaan Kependidikan, Keagamaan dan Kewirausahaan Lingkungan Masjid Nurul Huda Al-Jailani Desa Pringu Kecamatan Bululawang Kabupaten Malang, November
- **2014** Sosialisai Analisis Kandungan Amonia pada Sumber Air dan Sosialisasi Penjernihan Air Menggunakan Biji Kelor Di Desa PAndansari Kecamatan Ngantang Kabupaten Malang, Oktober
- **2014** Pengabdian Masyarakat Tematik Posdaya Berbasis Masjid di Masjid Al-Chasan Desa Ngebruk dan Masjid Baitus Salam Desa Robyong Kecamatan Poncokusumo Kabupaten Malang, Desember
- **2015** Pengabdian Masyarakat Analisis Kualitas Sumber Air Secara Bakteriologi serta Sosialisasi Pembuatan Yogurt dan Pemanfaatannya Di Desa PAndansari Kecamatan Ngantang Kabupaten Malang, Oktober
- **2015** Pengabdian Masyarakat Tematik Posdaya Berbasis di Desa Srigoncoda Dusun Durmo Kc. Bantur Kabupaten Malang, Desember

Hal : Undangan

Kepada:

Yth. Bapak/ Ibu/ Sdr

.....  
Di Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki  
Malang

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

Dengan hormat, mengharap kehadiran Bapak/ Ibu/ Sdr pada:

Hari/Tanggal : Rabu, 2 Maret 2016

Pukul : 08.00 WIB s.d selesai

Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek

Acara : Seminar Proposal Penelitian Kompetitif Individual Program Bantuan Dana Penelitian Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang tentang **“POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp*”**.

Demikian undangan kami, atas perhatiannya disampaikan terimakasih.

*Wassalamu'alaikum Wr.Wb*

Malang, 25 Februari 2016  
Peneliti,

A. Ghanaim Fasya, M.Si  
NIP. 19820616 200604 1 002

**JADWAL KEGIATAN**  
**SEMINAR POPOSAL PENELITIAN KOMPETITIF INDIVIDUAL**  
**PROGRAM BANTUAN DANA PENELITIAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

Hari/Tanggal : Rabu, 2 Maret 2016

Pukul : 08.00 WIB s.d selesai

Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek

<b>Jam</b>	<b>Acara</b>	<b>Tema</b>	<b>Narasumber</b>
08.00-08.30	Pembukaan		
08.30-10.30	Presentasi Proposal Penelitian	<b>Potensi Antikanker Dan Antioksidan Serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp</i></b>	A. Ghanaim Fasya, M.Si.
10.30-11.30	Diskusi dan Tanya jawab		

Judul Penelitian : **POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp***

Peneliti : A. Ghanaim Fasya, M. Si. (NIP. 19820616 200604 1 002)

Jurusan : Kimia

Tanggal Pelaksanaan : 2 Maret 2016

Tempat Pelaksanaan : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia

[illegible]

Hal : Undangan

Kepada:

Yth. Bapak/ Ibu/ Sdr

.....

Di Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki  
Malang

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

Dengan hormat, mengharap kehadiran Bapak/ Ibu/ Sdr pada:

Hari/Tanggal : Kamis, 8 September 2016

Pukul : 12.30 WIB s.d selesai

Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek

Acara : Seminar Hasil Penelitian Kompetitif Individual Program Bantuan Dana Penelitian Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang tentang “**POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp*”**”.

Demikian undangan kami, atas perhatiannya disampaikan terimakasih.

*Wassalamu'alaikum Wr.Wb*

Malang, 31 Agustus 2016  
Peneliti,

A. Ghanaim Fasya, M.Si  
NIP. 19820616 200604 1 002

**JADWAL KEGIATAN**  
**SEMINAR HASIL PENELITIAN KOMPETITIF INDIVIDUAL**  
**PROGRAM BANTUAN DANA PENELITIAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

Hari/Tanggal : Kamis, 8 September 2016

Pukul : 12.30 WIB s.d selesai

Tempat : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia Fakultas Saintek

<b>Jam</b>	<b>Acara</b>	<b>Tema</b>	<b>Narasumber</b>
12.30-13.00	Pembukaan		
13.00-15.00	Presentasi Hasil Penelitian	<b>Potensi Antikanker Dan Antioksidan Serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp</i></b>	A. Ghanaim Fasya, M.Si.
15.00-16.00	Diskusi dan Tanya jawab		



Judul Penelitian : **POTENSI ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN SERTA IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID MIKROALGA *Chlorella sp***

Peneliti : A. Ghanaim Fasya, M. Si. (NIP. 19820616 200604 1 002)

Jurusan : Kimia

Tanggal Pelaksanaan : 8 September 2016

Tempat Pelaksanaan : Ruang Diskusi II Jurusan Kimia

[illegible]

## Dokumentasi Seminar Proposal





## Dokumentasi Seminar Hasil







